

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

КЛАССИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТСКИЙ УЧЕБНИК



КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Под редакцией В.А. Ткачука



Серия
**КЛАССИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТСКИЙ УЧЕБНИК**

основана в 2002 году по инициативе ректора

МГУ им. М.В. Ломоносова

академика РАН В.А. Садовниченко

и посвящена

250-летию
Московского университета



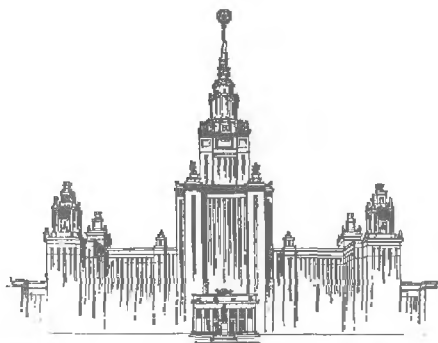
КЛАССИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТСКИЙ УЧЕБНИК

Редакционный совет серии:

Председатель совета
ректор Московского университета
В.А. Садовничий

Члены совета:

Виханский О.С., Голиченков А.К., Гусев М.В.,
Добреньков В.И., Донцов А.И., Засурский Я.Н.,
Зинченко Ю.П. (ответственный секретарь),
Камзолов А.И. (ответственный секретарь),
Карпов С.П., Касимов Н.С., Колесов В.П.,
Лободанов А.П., Лунин В.В., Лупанов О.Б.,
Мейер М.С., Миронов В.В. (заместитель председателя),
Михалев А.В., Моисеев Е.И., Пушаровский Д.Ю.,
Раевская О.В., Ремнева М.Л., Розов Н.Х.,
Салецкий А.М. (заместитель председателя),
Сурин А.В., Тер-Минасова С.Г.,
Ткачук В.А., Третьяков Ю.Д., Трухин В.И.,
Трофимов В.Т. (заместитель председателя), Шоба С.А.



Предисловие

Уважаемый читатель!

Вы открыли одну из замечательных книг, изданных в серии «Классический университетский учебник», посвященной 250-летию Московского университета. Серия включает свыше 150 учебников и учебных пособий, рекомендованных к изданию Учеными советами факультетов, редакционным советом серии и издаваемых к юбилею по решению Ученого совета МГУ.

Московский университет всегда славился своими профессорами и преподавателями, воспитавшими не одно поколение студентов, впоследствии внесших заметный вклад в развитие нашей страны, составивших гордость отечественной и мировой науки, культуры и образования.

Высокий уровень образования, которое дает Московский университет, в первую очередь обеспечивается высоким уровнем написанных выдающимися учеными и педагогами учебников и учебных пособий, в которых сочетаются как глубина, так и доступность излагаемого материала. В этих книгах аккумулируется бесценный опыт методики и методологии преподавания, который становится достоянием не только Московского университета, но и других университетов России и всего мира.

Издание серии «Классический университетский учебник» наглядно демонстрирует тот вклад, который вносит Московский университет в классическое университетское образование в нашей стране и, несомненно, служит его развитию.

Решение этой благородной задачи было бы невозможным без активной помощи со стороны издательств, принявших участие в издании книг серии «Классический университетский учебник». Мы расцениваем это как поддержку ими позиции, которую занимает Московский университет в вопросах науки и образования. Это служит также свидетельством того, что 250-летний юбилей Московского университета — выдающееся событие в жизни всей нашей страны, мирового образовательного сообщества.

Ректор Московского университета
академик РАН, профессор



В. А. Садовничий

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Под редакцией
чл.-корр. РАН, акад. РАМН
В.А. Ткачука

2-е издание, исправленное и дополненное

*Рекомендовано УМО по медицинскому и фармацевтическому
образованию вузов России в качестве учебного пособия
для студентов медицинских вузов*



Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД»
Издательство Московского университета
2004

Авторы:

В. Н. Бочков, А. Б. Добровольский, Н. Е. Кушлинский, В. А. Логинов,
Е. П. Панченко, Е. И. Ратнер, М. Г. Творогова, В. Н. Титов, В. А. Ткачук

Рецензенты:

Зав. кафедрой биохимии биологического факультета МГУ
им. М. В. Ломоносова проф. *Н. Б. Гусев*
Проф. кафедры биохимии медицинского факультета РУДН
акад. РАМН *Т. Т. Березов*

К49 Клиническая биохимия / Под ред. В. А. Ткачука. — 2-е изд., испр.
и доп. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 512 с. — (Классический универси-
тетский учебник).

ISBN 5-9231-0420-2

В учебном пособии представлены современные данные о прогности-
ческом значении определения в биологических жидкостях содержания
минеральных веществ, метаболитов, липидов и липопротеинов, активно-
сти ферментов, факторов свертывания крови и фибринолиза, содержания,
рецепции и внутриклеточной сигнализации гормонов и нейромедиаторов
при заболеваниях печени, сердечно-сосудистой системы, костной ткани
и эндокринных желез. Приведены примеры использования биохимических
тестов в диагностике внутренних болезней. Большое внимание уделено
практическому использованию достижений молекулярной биологии в кли-
нической практике.

Структура учебного пособия отражает сформировавшиеся за послед-
ние годы тенденции в клинической биохимии, а приведенные данные
позволяют ориентироваться в большом количестве современных методов
лабораторной диагностики.

Книга предназначена для студентов медицинских вузов, аспирантов,
ординаторов, клиницистов и врачей-лаборантов.

УДК 616:577.1(075.8)
ББК 52.5я73

*Права на данное издание принадлежат издательскому дому «ГЭОТАР-МЕД».
Воспроизведение и распространение в каком бы то ни было виде части или
целого издания не могут быть осуществлены без письменного разрешения
издательского дома.*

© Коллектив авторов, 2004
© Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД», 2004
© МГУ им. М. В. Ломоносова,
художественное оформление, 2004

ISBN 5-9231-0420-2

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	9
Список сокращений	16

Глава 1

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

(В.Н. Титов, М.Г. Творогова)

1.1. Кислотно-щелочное равновесие	19
Клиническое значение определения параметров	29
Метаболический ацидоз	31
Дыхательный ацидоз	36
Метаболический алкалоз	37
Дыхательный алкалоз	39
1.2. Белки и субстраты	40
Группы белков плазмы крови	41
Общий белок	42
Методы определения	44
Альбумины и глобулины	45
Билирубин	47
Клиническое значение гипербилирубинемии	48
Методы определения	50
Креатинин	53
Клиническое значение	54
Методы определения	55
Мочевая кислота	57
Клиническое значение	58
Методы определения	63
1.3. Ионы	64
Железо	65
Клиническое значение	68
Методы определения	68
Кальций	73

Клиническое значение	74
Методы определения	76
Магний	78
Клиническое значение	80
Методы определения	83
Натрий	86
Клиническое значение	88
Калий	89
Клиническое значение	91
Методы определения натрия и калия	96
Фосфор	98
Клиническое значение	99
Методы определения	100
1.4. Ферменты	103
Аланин- и аспаратаминотрансфераза	103
Клиническое значение определения концентрации аминотрансфераз	104
Методы определения аминотрансфераз	106
Амилаза	107
Клиническое значение определения активности амилазы в сыворотке крови	108
Методы определения активности амилазы	110
γ-Глутамилтранспептидаза	113
Клиническое значение определения концентрации ГГТ в сыворотке крови	115
Методы определения активности ГГТ	117
Креатинкиназа	117
Клиническое значение определения активности КК и ее изоферментов	119
Методы определения активности КК	121
Лактатдегидрогеназа	123
Клиническое значение определения активности ЛДГ	124
Методы определения активности ЛДГ	128
Щелочная фосфатаза	130
Клиническое значение определения активности ЩФ	131
Методы определения активности ЩФ	135
1.5. Липиды и липопротеины	136
Липопротеины	139
Клиническое значение определения липопротеинов в крови	147
Диагностические критерии гиперлипопроteinемий	151

Гиполиппротеинемии	153
Триглицериды	153
Клиническое значение определения концентрации ТГ	155
Методы определения содержания ТГ в крови	157
Холестерин	160
Клиническое значение гиперхолестеринемии	162
Методы определения холестерина в сыворотке	163

Глава 2

СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА

(А.Б. Добровольский, Е.П. Панченко)

2.1. Компоненты системы свертывания	167
Факторы системы свертывания крови	168
Белки-регуляторы активности протеаз свертывания крови ..	172
Фибриноген	173
Активация свертывания крови	178
Внутренний путь	179
Внешний путь	181
Образование тромбина	182
Положительные обратные связи	183
Функция фосфолипидов	184
2.2. Система противосвертывания	185
Ингибиторы сериновых протеаз	185
Антитромбин III	186
Кофактор II гепарина	193
Протеазный нексин-I	194
Ингибитор тканевого фактора	195
2.3. Система протеина С	197
Протеин С	197
Тромбомодулин	198
Протеин S	200
Система протеина С в регуляции	201
Инактивация протеина С	202
Наследственный и приобретенный дефицит	203
Резистентность и тромбозы	204
Антифосфолипидный синдром	206
Плазминоген и плазмин	208
Ингибиторы лизиса фибрина	211
Расщепление фибриногена и фибрина плазмином	214
Активаторы плазминогена	215

Ингибиторы активаторов плазминогена ..	219
Стрептокиназа ..	223
2.4. Роль тромбоцитов и сосудистой стенки в патогенезе артериального тромбоза ..	224
2.5. Методы исследования системы гемостаза ..	238
2.5.1. Забор крови для коагулологических анализов ..	238
2.5.2. Скрининговые тесты ..	239
2.5.3. Протромбиновый тест ..	241
2.5.4. Активированное частичное тромбопластиновое время ..	249
2.5.5. Тромбиновое время ..	252
2.5.6. Рептилазное время ..	254
2.5.7. Определение фибриногена ..	255
2.5.8. Определение волчаночных антикоагулянтов ..	258
2.5.9. Специальные методы исследования компонентов системы гемостаза ..	261
2.5.10. Антитромбин III ..	264
2.5.11. Протеин С ..	265
2.5.12. Протеин S, плазминоген, α_2 -антиплазмин и тканевый активатор плазминогена ..	266
2.5.13. Ингибитор активаторов плазминогена ..	269
2.5.14. Иммунологические методы исследования системы гемостаза ..	269

Глава 3

НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ СИСТЕМА

(В.А. Ткачук, В.А. Логинов, Е.И. Ратнер)

3.1. Взаимосвязь между нервной и эндокринной системами ..	274
3.2. Взаимосвязь между хемо- и механорецепцией.	284
3.3. Регуляция образования и распада гормонов ..	286
3.3.1. Белково-пептидные гормоны ..	287
3.3.2. Стероидные гормоны ..	290
3.3.3. Тиреоидные гормоны ..	296
3.3.4. Катехоламины ..	299
3.3.5. Простагландины ..	303
3.4. Секреция и молекулярные механизмы действия гормонов ..	305
3.5. Нарушения эндокринных функций ..	310
3.5.1. Гипоталамус и гипофиз ..	311

Гипопитуитаризм	312
Гиперпитуитаризм	313
Оценка функции	314
3.5.2. Половые железы	317
3.5.2.1. Женские половые железы	317
3.5.2.2. Мужские половые железы	322
3.5.3. Щитовидная железа	324
Снижение функции	325
Повышение функции	326
Оценка функции	327
3.5.4. Надпочечники	329
Кора надпочечников	329
Мозговая часть надпочечников	332
Дисфункция коры надпочечников	333
Дисфункция мозговой части надпочечников	337
3.5.5. Поджелудочная железа	338
Инсулин	338
Глюкагон	341
Сахарный диабет	341
Диагностика и мониторинг	345
Долговременные показатели	348
Лабораторная диагностика метаболических осложнений	348

Глава 4

БИОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

4.1. Сердечно-сосудистая патология (В.Н. Титов)	350
4.2. Болезни печени (В.Н. Титов)	361
4.3. Патология костной ткани (В.Н. Титов)	371
Роль ПТГ	371
Первичный гиперпаратиреоз	372
Вторичный гиперпаратиреоз	372
Гипопаратиреоз	373
Псевдогипопаратиреоз	373
Роль кальцитонина	373
Остеопороз	374
Остеодистрофии	376

4.4. Маркеры злокачественного роста (Н.Е. Кушлинский) . . .	377
4.4.1. Интерпретация результатов тестирования опухолевых маркеров	379
4.4.2. Колоректальный рак	381
Раково-эмбриональный антиген	388
СА-19-9 и α -фетопротеин	390
Маркеры апоптоза	391
Активаторы и ингибиторы системы плазминогена	392
Рецепторы факторов роста	394
Опухолевые маркеры ангиогенеза	396
Ферменты	398
Другие маркеры КРР	401
4.4.3. Раковые заболевания поджелудочной железы, желудка, пищевода и печени	402
Поджелудочная железа	402
Желудок	402
Рак пищевода	403
Гепатоцеллюлярная карцинома	403
4.4.4. Новообразования органов женской репродуктивной системы	404
Опухоли яичников	405
Рак молочной железы	407
Тканевые маркеры при раке молочной железы	408
Рак шейки матки	415
Рак эндометрия	417
4.4.5. Рак легкого	417
4.5. Молекулярно-генетическая диагностика (В.Н. Бочков) . .	423
4.5.1. Типы генетических перестроек	425
4.5.2. Особенности применения ДНК-диагностики	453
4.5.3. Примеры использования ДНК-диагностики в клинике	458
4.5.3.1. Гемохроматоз	459
4.5.3.2. Наследственные тромбофилии	462
4.5.3.3. Семейная гиперхолестеринемия	468
4.5.3.4. Кистозный фиброз	473
4.5.3.5. Гипертрофическая кардиомиопатия	475
Список литературы	478
Справочник терминов	479
Предметный указатель	503

ВВЕДЕНИЕ

Врожденные генетические дефекты, неправильное питание, недостаток кислорода, действие токсичных веществ, анафилактика и т.п. приводят к изменению скорости определенных биохимических реакций, а это влияет на функционирование и структуру клеток, тканей и органов. В связи с этим *задачей современной клинической биохимии является выявление диагностически и прогностически значимых нарушений протекания биохимических реакций в организме человека.*

Клиническая биохимия является важнейшим разделом лабораторной диагностики, наряду с клинической гематологией, иммунологией, клинической серологией и микробиологией, фармакокинетикой, клинической токсикологией.

Каждый из разделов обладает специфическим набором аналитического оборудования, включает сотни диагностических методов, многие из которых дают клиницисту возможность разобраться в вопросах как патогенеза патологического процесса, так и его этиологии. Наибольшим числом диагностических тестов, наибольшим объемом информации и перспективами развития располагает клиническая биохимия.

Клиническую биохимию можно охарактеризовать как биохимию на службе диагноза и лечения. Только за последнее десятилетие клиническая биохимия пополнилась несколькими сотнями новых диагностических исследований, включая цитокины, онкомаркеры, тесты оценки некротического процесса и апоптоза, факторы функционального межклеточного взаимодействия, ДНК-диагностику.

Клиническая лабораторная диагностика доминирует в постановке диагноза в эндокринологии, патологии паренхиматозных органов и миокарда, в гастроэнтерологии, токсикологии, при нарушениях иммунного статуса, оценке этиологии инфекционного

процесса, диагностике и мониторинговании состояния больного в неотложных состояниях, в отделении реанимации и блоке интенсивной терапии.

Высокая потребность в клинических лабораторных исследованиях является основой становления автоматизации лабораторного диагностического процесса. В современной лаборатории задействованы биохимические, иммунологические, иммунохимические, микробиологические анализаторы. Большое распространение получили методы «сухой химии» (диагностические полоски и слайды), принцип полимеразной цепной реакции, технология микрочипов для ДНК-диагностики.

Многие диагностические дисциплины в клинической медицине основаны на использовании одного физико-химического метода; это относится к рентгенологии, радиологии, ультразвуковым методам. В клинической лаборатории одновременно задействованы многие физико-химические методы: спектрофотометрия, флюорометрия, поляризация флюоресценции, амперометрия, потенциометрия, кулонометрия, разные виды хроматографии, масс-спектрометрия, ядерно-магнитный резонанс, специфические методы биофизики.

Поскольку каждое измерение является процедурой сравнения с общепризнанным эталоном, клиническая лабораторная диагностика отработала многие десятки стандартных образцов, которые являются национальными и интернациональными. Создана строгая и стройная система стандартизации, которая позволяет сопоставлять результаты диагностических исследований, выполненных в разных лабораториях, городах, странах. Процедура стандартизации необходима для проведения международных популяционных исследований и имеет важное значение для организации здравоохранения.

Процедура стандартизации и приготовления стандартных образцов потребовала отработки референсных методов. Референсным методом считают тот один отработанный, порой очень сложный метод, который характеризуется наиболее высокой аналитической чувствительностью и аналитической специфичностью. Именно его используют для аттестации стандартных образцов; референсные методы существуют для большинства диагностических тестов, которыми располагает клиническая биохимия.

Используя процедуру стандартизации, единые статистические приемы и принципы организации популяционных исследований, клиническая биохимия устанавливает границы нормальных значений для каждого из исследуемых образцов во всех биологических жидкостях. Интервалы нормы являются величинами, которые характеризуют большие популяции, в ряде случаев целые страны. При этом нет необходимости формировать локальные интервалы нормы при отсутствии выраженных географических или этнических особенностей населения. Границы нормы получены путем статистических преобразований результатов биохимических исследований в популяции, и в диагностическом процессе необходимо учитывать особенности формирования интервала нормы, а также интервал изменения параметров биохимического теста при патологическом процессе.

Клиническому биохимику обычно недоступны для анализа органы и ткани, в которых развивается патологический процесс, — он довольствуется исследованием жидкостей организма и по содержанию или структуре специфических молекул-маркеров, перешедших в эти жидкости, осуществляет диагностику заболевания.

Неотъемлемой частью клинической лабораторной диагностики является система контроля качества. Основу системы составляет ежедневное использование одной и той же контрольной пробы в течение длительного времени. Статистическая обработка результатов подобных исследований позволяет построить достоверный интервал, в пределах которого только и возможны колебания результатов исследования контрольной пробы для каждого из исследуемых параметров. Если в популяционных исследованиях необходимо использовать диагностические лабораторные тесты, для которых еще не отработаны стандартные и контрольные образцы, формируют централизованную лабораторию. В такой лаборатории на одном оборудовании и одними руками проводят весь объем исследования, получая полную возможность сопоставления результатов, полученных разными участниками кооперативного исследования.

Система контроля качества состоит из трех больших этапов: преаналитического, аналитического и постаналитического. Наиболее сложным в организационном плане и наиболее ответ-

ственным в плане влияния на полученные показатели в системе контроля качества является преаналитический этап — этап взятия биологического материала на исследование. На преаналитическом этапе множество факторов оказывает выраженное влияние на результаты последующего аналитического измерения: предшествующий прием пищи, положение больного сидя или лежа, курение, степень пережатия руки больного жгутом, соблюдение анаэробных условий взятия биологического материала, соблюдение стерильных условий, предшествующие физические нагрузки.

Во многих случаях для диагностики патологического процесса необходимо проведение функциональных проб с одновременным выполнением биохимических исследований: тесты с нагрузкой глюкозой, функциональные тесты оценки детоксикационной функции печени, многократное взятие крови на исследование, многократный сбор мочи при проведении функциональных тестов почек. Особенно большие трудности возникают при взятии крови на исследование у пациентов в отделении реанимации и неотложной терапии. В этих ситуациях при централизации кровообращения единственным достоверным способом взятия крови на исследование является использование подключичного катетера.

Аналитический этап контроля качества во всех лабораториях является наиболее совершенным. При наличии в лаборатории биохимических автоматизированных систем выполнение его происходит автоматически, включая и статистические параметры оценки внутрилабораторного контроля качества для каждого из исследуемых параметров. Использование при определении каждого из анализируемых образцов трех контрольных проб с низким, нормальным и высоким значением исследуемого параметра позволяет проконтролировать весь интервал (линейность) проводимых измерений. Умение оценивать результаты контроля качества во многом способствует высокому качеству диагностического процесса, поскольку широкие интервалы физиологических значений могут быть результатом суммы случайных ошибок, а динамика биохимических показателей при длительном наблюдении может быть результатом систематических ошибок.

Наиболее сложным этапом контроля качества является пост-аналитический. Суть этого этапа составляет диагностическая интерпретация выполненных исследований и порой многочисленных результатов (концентрация метаболитов, ионов, парциальное давление газов, каталитическая активность ферментов, концентрация водородных ионов). Интегральная оценка многочисленных конкретных результатов, формирование при ряде патологических процессов биохимического диагноза, выделение основного патологического процесса, его осложнений, сопутствующих заболеваний зависят от квалификации сотрудников лаборатории, степени их коллегиального взаимодействия с клиницистами.

Умение трактовать результаты лабораторных тестов, не назначать ненужные лабораторные исследования, умение вести диагностический процесс на основании лабораторных данных не вширь, а вглубь во многом характеризует профессиональный уровень специалиста клинической лабораторной диагностики. Организационные вопросы диагностического процесса при каждой нозологической форме заболевания, необходимый объем и частоту повторения лабораторных тестов регламентирует документ, именуемый стандартом. Стандарт для каждой нозологической формы заболевания вырабатывают эксперты — клиницисты, специалисты клинической лабораторной диагностики и медицинского страхового общества. Документ регламентирует оснащение медицинского учреждения, в том числе и клинικο-диагностической лаборатории, объем лабораторного исследования, частоту повторения тестов в штатных ситуациях, объем лечебных мероприятий.

Оценка порой разрозненной диагностической лабораторной информации, ее обобщение и формирование диагноза являются основой диагностического процесса в клинικο-диагностической лаборатории. В настоящее время совершенствование диагностического процесса проходит путем внедрения в диагностический процесс большего числа количественных показателей при доминировании в технологии лабораторной диагностики спектрофотометрии, электрофореза и хроматографии, иммунохимии и ионоселективного анализа. Интегрирование же полученной информации проводит клинический патолог, руководствуясь при этом общими принципами патологии.

Клиническая лабораторная диагностика вносит свой вклад и в решение теоретических проблем биологии человека. Это относится к выявлению таких регуляторных закономерностей, которые характерны только для человека: психоэмоциональные сдвиги и их воздействие на процессы метаболизма, позитивное терапевтическое действие плацебо, метаболические нарушения при врожденных дефектах метаболизма.

Следует заметить, что не все устоявшиеся представления о течении и регуляции физиологических процессов являются незыблемыми: со временем некоторые из них будут конкретизированы, скорректированы или заменены новыми. При этом роль клинической лабораторной диагностики будет оставаться высокосignимой, поскольку именно она отработает новые функциональные тесты, новые интегральные биофизические методы исследования.

В настоящее время формируются новые концепции, в частности инсулинорезистентности, отдельного переноса и поглощения клетками насыщенных и полиеновых жирных кислот, выделяются новые виды патологии.

Однако все вышесказанное и дальнейшее совершенствование клинической лабораторной диагностики будут возможны только при условии, что удастся подготовить высококвалифицированные кадры молодых специалистов, которые будут обладать большим объемом знаний, в первую очередь физики и химии, общей биологии, сравнительной физиологии и молекулярной биологии, а также клинических дисциплин. Такие специалисты обеспечат взаимопонимание и взаимопроникновение, единение всей информации, которая составляет основу живого и явится единственным условием дальнейшего совершенствования медицинских знаний, решения многих сложных вопросов этиологии и патогенеза заболеваний.

Для эффективного использования в клинике данных биохимического анализа врач должен понимать взаимосвязь между молекулярными процессами и физиологическими функциями клетки и организма. Несмотря на широкое использование методов клинической биохимии в практическом здравоохранении, до сих пор данная дисциплина не является обязательной в программе высшего медицинского образования. В медицинских вузах курса

медицинской биохимии или вовсе нет, или же он читается как факультативный предмет.

Настоящая книга написана теми, кто в течение нескольких лет читал лекции по клинической биохимии на факультете фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Как показал опыт преподавания этой дисциплины, из года в год постоянно усиливается интерес к данному предмету не только у студентов-медиков — многие практикующие врачи, несмотря на большую занятость в клиниках, стремятся посетить лекции по клинической биохимии. Отчасти это связано с тем, что число учебников и практических руководств по клинической биохимии на русском языке ограничено.

Данное учебное пособие рассчитано на любознательных и, говоря языком современной молодежи, «продвинутых» студентов-медиков, ординаторов и аспирантов, а также научных медицинских работников и практикующих клиницистов. Здесь читатель найдет самые современные сведения о том, как в диагностике заболеваний используются анализы минеральных веществ, ферментов, липидов, липопротеинов, гормонов, факторов свертывания крови, фибринолиза и других химических компонентов организма.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- C1, C2, C3 и т. д. — компоненты системы комплемента 1, 2, 3 и т. д.
- EDRF — endothelium derived relaxing factor (nitric oxide, NO) — вырабатываемый в эндотелии фактор релаксации (вазодилатации), оксид азота (NO)
- ELAM — endothelial leukocyte adhesion molecule — молекула адгезии эндотелия и лейкоцитов
- ICAM — intercellular adhesion molecule — внутриклеточная молекула адгезии эндотелия и лейкоцитов
- LT — leucotrienes — лейкотриены
- PG — prostaglandins — простагландины
- NO — см. EDRF
- PAF — platelet activating factor — фактор, активирующий тромбоциты
- PDGF — platelet derived growth factor — тромбоцитарный фактор роста
- TGF — transforming growth factor — трансформирующий фактор роста
- TNF — tumor necrosis factor — фактор некроза опухолей
- Аг — антиген(ы)
- АД — артериальное давление
- АДФ — аденозиндифосфорная кислота, аденозиндифосфаты
- АКТГ — адренокортикотропный гормон, кортикотропин
- АЛТ — аланинаминотрансфераза
- цАМФ — циклический аденозин-3',5'-монофосфат
- апоЛП — аполипопротеин(ы)
- АПФ — ангиотензинпревращающий фермент
- АСТ — аспартатаминотрансфераза
- АТ — антитело, антитела

- АТФ — аденозинтрифосфорная кислота, аденозинтрифосфаты
 АТФаза — аденозинтрифосфатаза
 АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время
 ВМК — высокомолекулярные кининогены
 ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
 ГК — гепарина кофактор
 ГлДГ — глутаматдегидрогеназа
 ГЛП — гиперлиппротеинемия
 ГГТ — γ -глутамилтранспептидаза
 ГМК — гладкомышечная(ые) клетка(и)
 ГФ — гликогенфосфорилаза
 Д — дальтон
 ДВС — диссеминированное внутрисосудистое свертывание
 ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
 ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
 ИАП — ингибитор активатора плазминогена
 ИБС — ишемическая болезнь сердца
 ИВЛ — искусственная вентиляция легких
 ИЛ — интерлейкин(ы)
 ИФА — иммуноферментный анализ
 ИФН — интерферон
 КК — креатинкиназа
 ККС — калликреин-кининовая система
 КФ — классификация ферментов
 (по <http://www.expasy.ch/sprot/enzyme.html>)
 КЩР — кислотно-щелочное равновесие
 ЛАП — лейцинаминопептидаза
 ЛГ — лютеинизирующий гормон
 ЛДГ — лактатдегидрогеназа
 ЛП — липопротеин(ы)
 ЛПВП — липопротеины высокой плотности
 ЛПНП — липопротеины низкой плотности
 ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности
 ЛППП — липопротеины промежуточной плотности
 МАО — моноаминоксидаза

МНО — международное нормализованное отношение
 МГ — миоглобин
 НАД — никотинамидадениндинуклеотид
 НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 НМК — низкомолекулярные кининогены
 Пг — плазминоген
 Пл — плазмин
 ПО — протромбиновое отношение
 ПрС — протеин С
 ПрС_а — активированный протеин С
 ПрS — протеин S
 ПТ — протромбиновый тест
 ПТГ — паратиреоидный гормон, паратгормон
 РНК — рибонуклеиновая кислота
 иРНК — информационная РНК
 рРНК — рибосомальная РНК
 РЭС — ретикулоэндотелиальная система
 ССС — сердечно-сосудистая система
 тАП — тканевый активатор плазминогена
 ТВ — тромбиновое время
 ТГ — триглицериды
 УЗИ — ультразвуковое исследование
 фФВ — фактор фон Виллебранда
 ФСГ — фолликулостимулирующий гормон
 ХМ — хиломикроны
 ХЭ — холинэстераза
 ЧСС — частота сердечных сокращений
 ЦНС — центральная нервная система
 ЩФ — щелочная фосфатаза
 ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота
 ЭКГ — электрокардиография
 ЭФ — электрофорез

1.1. КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОЕ РАВНОВЕСИЕ

При планомерно проводимом лабораторном диагностическом процессе во многих разделах клинической медицины основное значение имеет определение субстратов, специфических белков, активности ферментов, в связи с чем применяют методы клинической биохимии. В отличие от этого в диагностике неотложных состояний, особенно в отделении реанимации, когда приходится диагностировать пограничные состояния между жизнью и смертью, доминируют методы, отражающие состояние жизненно важных физико-химических процессов. Основу неотложной диагностики составляют определения кислотно-щелочного равновесия (КЩР), парциального давления кислорода и углекислоты крови, состояния буферных систем крови, ионного состава внеклеточной среды, объема внеклеточной и внутрисосудистой жидкости, осмолярности биологических жидкостей, параметров свертывающей системы крови и диссоциации гемоглобина. В неотложных состояниях при отравлениях появляется реальная необходимость определять параметры гемоглобина, фракционный состав гемоглобина — наличие карбоксигемоглобина, тиогемоглобина, способности оксигемоглобина к диссоциации. В настоящее время в реанимационных отделениях имеются анализаторы КЩР, которые одновременно из одной пробы крови, взятой в анаэробных условиях, определяют все параметры КЩР, буферные системы крови, парциальное давление кислорода и углекислоты, содержание в крови гемоглобина, глюкозы,

лактата и фракции гемоглобина. Основное место в диагностике неотложных состояний занимает определение параметров КЩР.

В поддержании КЩР принимают участие:

- буферные системы крови;
- внутриклеточный метаболизм, в процессе которого образуется и используется ион водорода;
- легкие, удаляющие углекислый газ;
- почки, реабсорбирующие бикарбонат и выделяющие ион водорода в форме NH_4^+ и H_3PO_4 .

В результате метаболических процессов в организме образуются ионы H^+ и CO_2 . В покое человек выделяет 230 мл CO_2 в 1 мин или около 15000 ммоль/сут. Потенциально это сопровождается исчезновением из крови 15 моль H^+ (летучие кислоты). Летучие кислоты экскретируются из организма только через легкие. В организме примерно 1 ммоль/(кг·сут) H^+ образуется в виде нелетучих кислот, таких, как H_2SO_4 и H_3PO_4 . Они экскретируются почками.

Значение рН артериальной крови обозначают символом pH_a , в норме поддерживающимся в ограниченном диапазоне между 7,37 и 7,44. Отклонение pH_a за эти границы означает нарушение КЩР. Значения рН ниже 7,37 свидетельствуют об ацидемии (в крови) и ацидозе (в ткани). Значения рН выше 7,44 указывают на развитие алкалемии (в крови) или алкалоза (в ткани). В рутинной практике традиционно при анализе крови используют термины «ацидоз» и «алкалоз».

pH_a зависит от величины легочной вентиляции, функции почек, уровня оксигенации, интенсивности метаболических реакций, состояния гемодинамики и др. Рассмотрение этих факторов выявляет два основных звена регуляции КЩР — дыхательное и метаболическое. Регистрация только pH_a не позволяет установить возможные причины нарушения КЩР; чтобы определить дыхательный и метаболический компоненты, необходимо исследовать дополнительные параметры.

pCO_2 — парциальное давление углекислого газа. В пробах артериальной крови его принято обозначать как p_aCO_2 . Этот показатель отражает количество растворенного CO_2 в плазме. CO_2 находится также в составе угольной кислоты (H_2CO_3), иона

бикарбоната (HCO_3^-), в комбинации с разными белками плазмы и в связанном виде с гемоглобином.

В капиллярах CO_2 диффундирует в эритроциты, где при взаимодействии с водой превращается в H_2CO_3 , реакция катализируется карбонатдегидратазой. H_2CO_3 в свою очередь диссоциирует на H^+ , который связывается гемоглобиновым буфером, и HCO_3^- , который выходит из клеток в обмен на ионы Cl^- . В альвеолах процесс проходит в обратном направлении и CO_2 удаляется с выдыхаемым воздухом.

При нормальной вентиляции $p_a\text{CO}_2$ находится в диапазоне 38–42 мм рт.ст. (5,06–5,60 кПа). Некоторые авторы считают нормальным диапазон $p_a\text{CO}_2$ 35–45 мм рт.ст. (4,7–6,0 кПа). Патологическими значениями считают отклонения за пределы <30 и >50 мм рт.ст. (< 4 и > 6,7 кПа).

Накопление или уменьшение количества CO_2 существенно влияют на КЩР. Так как растворение CO_2 сразу же сопровождается образованием угольной кислоты, то накопление CO_2 приводит к ацидозу, поэтому при гиповентиляции развивается дыхательный ацидоз. При гипервентиляции CO_2 избыточно удаляется из организма и пополняется из нестойкой HCO_3^- . В результате снижается концентрация H^+ , увеличивается рН, развивается дыхательный алкалоз.

Норма: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$.

Гиповентиляция: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$.

Гипервентиляция: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$.

Определение $p_a\text{CO}_2$ используют как индекс, отражающий дыхательный компонент КЩР.

Непосредственно поддержание постоянства рН крови осуществляют буферные системы, из которых наиболее важен бикарбонатный буфер. Емкость этого буфера, а значит и физиологическая способность противостоять изменениям концентрации иона H^+ , составляют более половины всей буферной емкости крови.

Составные части этого буфера — угольная кислота (H_2CO_3) и ионы бикарбоната (HCO_3^-). Угольная кислота — нестойкое соединение, разлагается с образованием воды и двуокиси углерода, углекислый газ через дыхательную систему удаляется в атмосфе-

ру. Учитывая эту особенность, бикарбонатную буферную систему называют летучим буфером. Основными параметрами, определяющими вклад бикарбонатной системы в регуляцию КЩР, служат парциальное давление двуокиси углерода и концентрация бикарбоната в крови. Концентрацию бикарбоната можно использовать в качестве показателя метаболического компонента КЩР. Нормальная концентрация HCO_3^- составляет 22–26 ммоль/л.

При оценке бикарбоната с помощью анализаторов регистрируют 2 показателя — истинный (актуальный) бикарбонат и стандартный бикарбонат.

Истинный бикарбонат (HCO_3^- -act). Уравнение Хендерсона-Хассельбаха для концентрации иона бикарбоната решается следующим образом:

$$\lg[\text{HCO}_3^-] = \text{pH} + \lg(\text{pCO}_2 \times 0,0307) - 6,105.$$

Рассчитанная по уравнению концентрация бикарбоната эквивалентна его активности в водной части плазмы, так как pH и CO_2 измеряют для водной части плазмы. Для истинной плазмы могут быть определенные отклонения $[\text{HCO}_3^-]$, если в ней увеличено содержание липидов и белков. Правильнее использовать рассчитанные значения, чем измеренные показатели.

Стандартный бикарбонат (HCO_3^- -std). Стандартный бикарбонат — концентрация всех форм бикарбоната в плазме, уравновешенной при pCO_2 40 мм рт.ст., при насыщении кислородом на 100%. При таком подходе определяют концентрацию бикарбоната, зависящую только от метаболизма, и полностью исключают влияние дыхания на этот показатель. Для расчета стандартного бикарбоната используют уравнение, предложенное Ван-Слайком:

$$[\text{HCO}_3^-] = 24,5 + 0,9A + (A - 2,9) \times (2,65 + 0,31 \times [\text{tHb}]) / 1000,$$

где $A = \text{BE} - 0,2 \times [\text{tHb}] \times [100 - \text{O}_{2\text{SAT}}] / 100$.

$[\text{tHb}]$ — концентрация общего гемоглобина — может быть измерена в той же пробе или введена в расчет дополнительно; BE — избыток или дефицит оснований — эмпирическое выражение, определяемое требуемым количеством кислоты или щелочи для титрования 1 л крови до достижения нормально-

го $pH = 7,4$; ВЕ при $pH = 7,4$, pCO_2 40 мм рт. ст. (5,33 кПа), общем гемоглобине 150 г/л и температуре 37 °С равен нулю. O_{2SAT} — сатурация (насыщение) гемоглобина — отношение (в процентах) объема кислорода, которое может связать то же количество гемоглобина.

Так как уравнения Хендерсона–Хассельбаха и Ван-Слайка не связаны между собой, то и рассчитанный по ним истинный и стандартный бикарбонат не может быть связан никакими пересчетными коэффициентами.

Хотя кроме бикарбонатного буфера в крови присутствуют другие основания и кислоты, тем не менее соотношение HCO_3^-/H_2CO_3 характеризуется высокой чувствительностью и динамичностью и отражает суммарные изменения системы кислоты/основания.

Действие бикарбонатного буфера дополняется в организме действием нелетучих буферных систем, наиболее важным из которых является гемоглобиновый буфер, составляющий около 1/3 всей буферной емкости крови. Кроме того, в организме существуют фосфатный и белковый буферы. При оценке способности крови противостоять изменению pH нужно принимать во внимание участие всех буферных систем крови.

Показателем, характеризующим это свойство, служит концентрация буферных оснований крови (ВВ).

ВВ (Buffer Bases) состоит из бикарбонатного и небикарбонатного буферных компонентов (БУФ):

$$ВВ = [HCO_3^-] + [БУФ].$$

Значение этого параметра слабо зависит от изменения парциального давления углекислого газа в крови, но отражает тканевый метаболизм и частично функцию почек. По величине ВВ можно судить о сдвигах КЩР, связанных с увеличением или уменьшением содержания нелетучих кислот в крови. В норме ВВ составляет 48 ммоль/л. Эту величину обозначают как норму буферных оснований (NBB), или должную концентрацию буферных оснований.

Производным по отношению к концентрации буферных оснований и удобным для оценки служит показатель избытка или недостатка буферных оснований (ВЕ, Bases Excess), опре-

деляемый разницей между истинной и должной концентрацией буферных оснований:

$$BE = BB - NBB.$$

Очевидно, что в норме BE равен нулю. Учитывая биологическую вариабельность, принято считать референсными значениями BE:

- для взрослых $0 \pm 2,5$ ммоль/л;
- для детей 0 ± 3 ммоль/л.

При патологическом увеличении содержания буферных оснований BE становится положительным, а при снижении — отрицательным. В последнем случае лучше использовать термин «дефицит оснований». Этот параметр имеет значительное клиническое и диагностическое значение. Он позволяет:

- 1) оценить степень метаболической компенсации дыхательных нарушений КЩР;
- 2) оценить степень метаболических нарушений КЩР;
- 3) вычислить общий недостаток (избыток) оснований (OBE) всего организма с помощью формулы:

$$OBE = 0,3 \times \text{масса тела} \times BE.$$

Значение OBE — основа для определения дозировки лекарственных препаратов, используемых для коррекции метаболических нарушений.

Таким образом, имеется возможность оценить вклад метаболического и дыхательного компонентов в изменение КЩР (рис. 1.1).

Буферные системы крови отражают активность всех гомеостатических механизмов, которые влияют на $[H^+]$ или pH через изменение двух компонентов: метаболического (недыхательного), который можно оценить по величине BB (BE); дыхательного, который можно оценить по CO_2 (p_aCO_2).

Это позволяет более объективно характеризовать состояние КЩР организма, поскольку возможна независимая оценка метаболической и дыхательной функций.

Клетки служат постоянным источником углекислого газа и нелетучих кислот (рис. 1.2). Как нелетучие кислоты, так и CO_2 в плазме способствуют повышению концентрации ионов

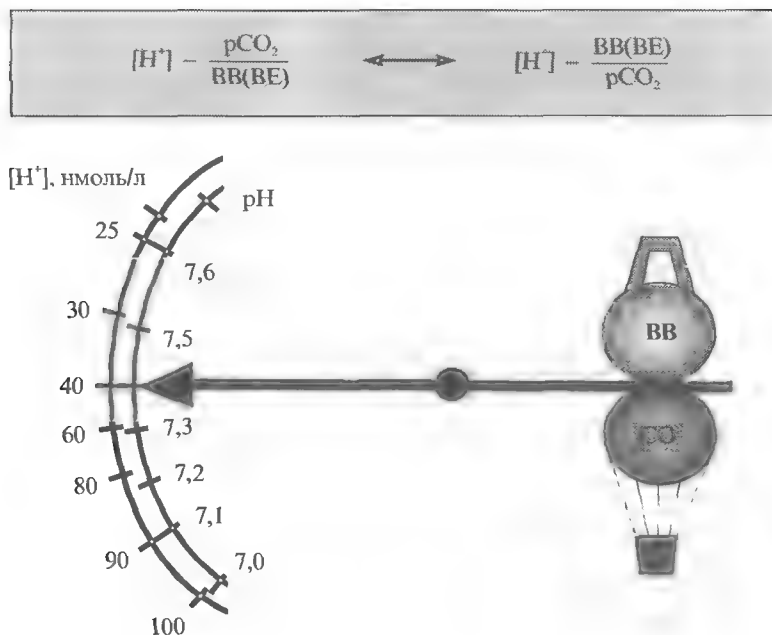


Рис. 1.1. Кислотно-щелочное равновесие крови.

H^+ . Индикатором способности клеток утилизировать ионы H^+ служит изменение содержания калия в плазме. Это происходит в результате того, что поступление H^+ в клетку связано с перемещением K^+ из нее. Поэтому чаще всего ацидоз сопровождается гиперкалиемией, а алкалоз — гипокалиемией. Показатель, в значительной степени отражающий количество образованных и/или задержанных в организме нелетучих кислот, — анионный интервал (АИ) плазмы крови.

Значение АИ рассчитывают из разницы концентраций катионов натрия и 2 главных анионов — хлора и бикарбоната:

$$АИ = ([Na^+] + [K^+]) - [Cl^-] - [HCO_3^-].$$

АИ отражает концентрации тех анионов, которые фактически имеются в сыворотке, но обычно не определяются, включая отрицательно заряженные белки плазмы (в основном альбумины), фосфаты, сульфат и органические кислоты (например, молочную

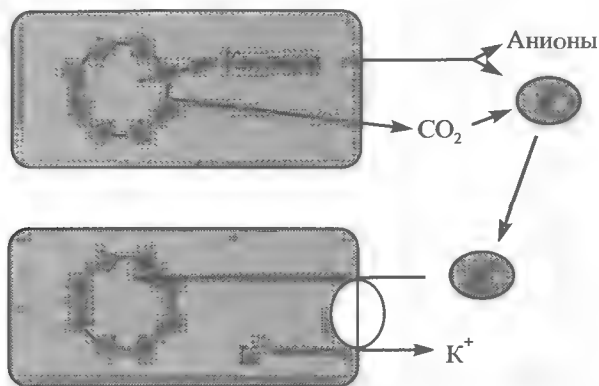


Рис. 1.2. Вклад клеток в поддержание кислотно-щелочного равновесия.

кислоту). В норме АИ составляет 16 ± 4 мэкв/л. Увеличение АИ чаще всего связано с накоплением органических кислот (ацидоз) или с гиперпротеинемией. Уменьшение АИ происходит при гипопроteinемии.

При метаболическом ацидозе органические анионы накапливаются одновременно с эквивалентным количеством ионов водорода. Так, при диабетическом кетоацидозе накапливаются ацетоацетат и гидроксibuтират, при лактоацидозе — лактат. При этом электронейтральность поддерживается за счет снижения бикарбоната. Существенное увеличение АИ наблюдается при отравлениях метанолом или этиленгликолем. Большинство видов метаболического ацидоза возникает в результате снижения уровня бикарбоната сыворотки без соответствующего повышения концентрации ионов хлора, что сопровождается увеличением АИ.

В то же время при почечном канальцевом ацидозе, связанном с потерей бикарбоната, происходит повышение концентрации в плазме ионов хлора и АИ будет в пределах нормы, поэтому расчет АИ имеет диагностическое значение. Хотя в клинических условиях причину метаболического ацидоза достаточно легко установить с помощью обычных анализов, тем не менее расчет АИ может быть полезен при анализе комплексных нарушений КЩР.

Особое значение для компенсации сдвигов КЩР имеет регуляция дыхания. Если в результате обменных нарушений кислотность крови увеличивается, то повышение содержания H^+ приводит к возрастанию легочной вентиляции (гипервентиляции); при этом молекулы CO_2 выводятся в большем количестве и рН возвращается к нормальному уровню. Напротив, увеличение содержания оснований сопровождается гиповентиляцией, в результате напряжение CO_2 и концентрация ионов H^+ возрастают, сдвиг реакции крови в щелочную сторону частично компенсируется. Другие органы также могут значительно влиять на КЩР, но не в состоянии заменить легкие и почки в выведении продуктов метаболизма.

Дыхательные нарушения КЩР часто связаны с заболеванием легких. Первичная функция дыхательной системы — поддерживать оптимальный уровень напряжения кислорода ($p\text{O}_2$) и углекислого газа ($p\text{CO}_2$) в артериальной крови. Эта функция обеспечивается тремя ключевыми процессами: вентиляцией, кровотоком и диффузией газов в легких. Нарушение каждого из них может привести к дыхательной недостаточности, которая определяется как снижение $p_a\text{O}_2$ ниже 8,0 кПа и/или повышение $p_a\text{O}_2$ выше 8,0 кПа в покое у пациентов, дышащих воздухом.

При альвеолярной гиповентиляции повышается альвеолярное и артериальное $p\text{CO}_2$ и падает альвеолярное и артериальное $p\text{O}_2$. Оценку альвеолярной вентиляции проводят путем измерения артериального $p\text{CO}_2$. Показатели крови при нормальном газообмене в покое при дыхании воздухом представлены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Показатели крови при нормальной функции легких

Показатель	Артериальная кровь	Венозная кровь
$[\text{H}^+]$	36–43 нмоль/л	35–45 нмоль/л
рН	7,37–7,44	7,37–7,44
$p\text{CO}_2$	5,06–5,60 кПа, 38–42 мм рт. ст.	4,8–6,7 кПа, 36–50 мм рт. ст.
$p\text{O}_2$	10,5–13,5 кПа, 85–95 мм рт. ст.	4,0–6,7 кПа, 30–50 мм рт. ст.

К параметрам, характеризующим функцию дыхательной системы, относят не только pO_2 и pCO_2 , но и насыщение гемоглобина кислородом (SO_2), общее содержание кислорода в крови (TO_2), фракцию оксигемоглобина в общем гемоглобине (O_2Hb) и другие параметры. Последние показатели в определенной степени характеризуют процессы тканевого обмена кислорода и его транспорт кровью.

Одна из функций почек — возможность поставки в кровоток дополнительных количеств ионов HCO_3^- , уравнивающих образование ионов H^+ в организме. Функция почек, направленная на поддержание КЩР, состоит из двух компонентов: реабсорбции HCO_3^- ; выведения H^+ с мочой. Реабсорбция HCO_3^- происходит главным образом в проксимальных канальцах нефрона (рис. 1.3).

Существует взаимосвязь между количеством реабсорбированного бикарбоната и ионами хлора. Так, увеличение реабсорбции HCO_3^- при нарушениях КЩР сопровождается снижением реабсорбции Cl^- и ведет к гипохлоремии. Поэтому определение концентрации Cl^- в плазме и HCO_3^- в моче может предоставить дополнительную информацию о типе нарушения КЩР.

Минимальное значение pH мочи может быть 4,6, что эквивалентно концентрации ионов H^+ 25 мкмоль/л. Так как за сутки обычно выделяется около 1,5 л мочи, то в свободном виде выделяется примерно только тысячная часть общего экскретируемого количества ионов H^+ . Основной буфер мочи фосфатный. При минимальном pH мочи практически все фосфаты находятся в форме $H_2PO_4^-$. За сутки примерно 30–40 ммоль ионов H^+ нормально экскретируются этим путем.

Аммиак, образуемый при дезаминировании глутамина в клетках дистальных канальцев, — важный буфер мочи. Фермент, катализирующий эту реакцию, глутаминаза — активируется при хроническом ацидозе, что сопровождается увеличением экскреции ионов водорода в виде ионов аммония (аммониогенез).

NH_3 может свободно диффундировать через клеточные мембраны, тогда как ион NH_4^+ такой способностью не обладает. В просвете почечного канальца формируется аммонийная буферная система. Отсюда следует, что определение выведенного с мочой аммония и одноосновных фосфатов (титруемая кислот-

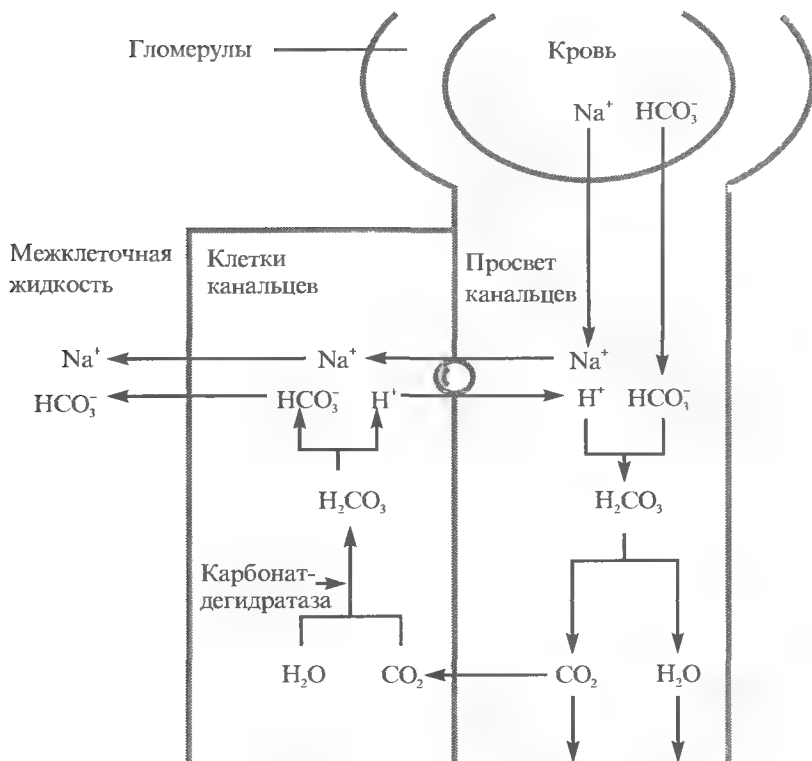


Рис. 1.3. Реабсорбция бикаarbonата в канальцах почек

ность) наряду с определением рН составляет основу для оценки функции дистальной части нефрона.

Клиническое значение определения параметров

Различают два основных типа нарушений КЩР — ацидоз ($\text{pH} < 7,37$) и алкалоз ($\text{pH} > 7,44$). Каждое из них может быть метаболическим или дыхательным (последний подразделяют на острый и хронический).

При первичном изменении pCO_2 говорят о первичном дыхательном нарушении КЩР; при первичном изменении концентрации бикаarbonата говорят о первичном метаболическом нарушении. И в том и в другом случае второй (зависимый) параметр

для поддержания рН в фиксированном диапазоне (7,37–7,44) изменяется в том же направлении, что и первый (нормальная компенсаторная реакция). Компенсаторные механизмы приводят только к ограничению сдвигов рН плазмы крови, но не предотвращают полностью их развитие. Важно понимать, что компенсаторная реакция со стороны легких происходит быстрее, чем таковая реакция со стороны почек (последняя может занимать 1–2 дня).

- Дыхание Куссмауля (равномерные редкие дыхательные циклы, глубокий шумный вдох и усиленный выдох) — компенсаторная реакция организма в ответ на метаболический ацидоз. Патогенез дыхания Куссмауля объясняют стимуляцией дыхательного центра повышенным (относительно бикарбоната) содержанием в крови pCO_2 .

- Урежение и ослабление дыхания — компенсаторная реакция организма в ответ на метаболический алкалоз.

ДВА ПРАВИЛА ПРИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ КЩР

Правило 1. Увеличение pCO_2 на 10 мм рт.ст. приводит к уменьшению рН на 0,08 и, соответственно, наоборот (т.е. налицо обратно пропорциональная зависимость между рН и pCO_2). 0,08 — минимальная величина, превышающая нормальный диапазон рН ($7,44 - 7,37 = 0,07$).

Правило 2. Увеличение HCO_3^- на 10 мэкв/л приводит к увеличению рН на 0,15 и, соответственно, наоборот (т.е. налицо прямая зависимость между рН и HCO_3^-).

Уточнение характера нарушения КЩР (метаболическое или дыхательное) проводят по направлению изменений концентраций двуокиси углерода и бикарбоната (табл. 1.2)

У пациентов с тяжелой патологией часто определяют два или даже три первичных нарушения КЩР. Результат этих нарушений может быть аддитивным, что проявляется выраженными изменениями рН (например, при метаболическом и сопутствующем дыхательном ацидозе), или нивелирующим, когда рН нормален (например, при метаболическом ацидозе и сопутствующем дыхательном алкалозе). Смешанное нарушение КЩР

Таблица 1.2. Основные нарушения КЩР

Нарушение КЩР	Первичная диспалзия	Вторичная диспалзия	Расчетная формула
Метаболический ацидоз	$\downarrow\downarrow\downarrow[\text{HCO}_3^-]$	$\downarrow\downarrow\text{pCO}_2$	$\text{pCO}_2 = 1,5 \times [\text{HCO}_3^-] + 8$
Дыхательный ацидоз (хронический)	$\uparrow\uparrow\uparrow\text{pCO}_2$	$\uparrow\uparrow[\text{HCO}_3^-]$	$\uparrow[\text{HCO}_3^-] = 4 \times \text{pCO}_2 / 10$
Дыхательный ацидоз (острый)	$\uparrow\uparrow\uparrow\text{pCO}_2$	$\uparrow[\text{HCO}_3^-]$	$\uparrow[\text{HCO}_3^-] = \text{pCO}_2 / 10$
Метаболический алкалоз	$\uparrow\uparrow\uparrow[\text{HCO}_3^-]$	$\uparrow\uparrow\text{pCO}_2$	$\uparrow\text{pCO}_2 = [\text{HCO}_3^-] \times 0,6$
Дыхательный алкалоз (хронический)	$\downarrow\downarrow\downarrow\text{pCO}_2$	$\downarrow\downarrow[\text{HCO}_3^-]$	$\downarrow[\text{HCO}_3^-] = 5 \times \text{pCO}_2 / 10$
Дыхательный алкалоз (острый)	$\downarrow\downarrow\downarrow\text{pCO}_2$	$\downarrow[\text{HCO}_3^-]$	$\downarrow[\text{HCO}_3^-] = 2 \times \text{pCO}_2 / 10$

можно заподозрить при выявлении значительной разницы между реальным и ожидаемым изменением второго (зависимого) параметра.

В практике можно встретить результаты, не поддающиеся логической интерпретации (например, pCO_2 50 мм рт. ст., HCO_3^- 18 мэкв/л, а $\text{pH} = 7,8$, т.е. pH щелочной, а двуокись углерода и бикарбонат отражают сдвиг КЩР в кислую сторону). Этот результат следует рассматривать как ошибку лаборатории, проводившей исследование.

Метаболический ацидоз

Метаболический ацидоз — наиболее частое нарушение КЩР, наблюдаемое в клинической практике (классический пример — диабетический кетоацидоз). Метаболический ацидоз характеризуется первичным снижением бикарбоната сыворотки и вторичным компенсаторным снижением pCO_2 , что клинически проявляется дыханием Куссмауля (т.е. в ответ на первичный метаболический ацидоз развивается вторичный дыхательный алкалоз). Метаболический ацидоз дифференцируют в зависимости от нормального или увеличенного анионного интервала (см. выше).

- Увеличение АИ отражает возрастание одной из этих долей, обычно органических кислот. При этом не происходит задержки хлора в почечных канальцах (нормохлоремический метаболический ацидоз).

- При отсутствии изменения АИ при снижении как концентрации бикарбоната плазмы, так и рН сыворотки предполагают первичную потерю бикарбоната или добавление минеральной кислоты. При этом происходит задержка хлора в почечных канальцах (гиперхлоремический метаболический ацидоз). Поэтому существенную роль в диагностике метаболического ацидоза может играть определение хлоридов в сыворотке.

Клинический пример. Молодой пациент 21 года поступил в приемный покой с температурой тела 38 °С и запахом ацетона изо рта (рН 7,35, $p\text{CO}_2$ 17 мм рт. ст., HCO_3^- 9 мэкв/л).

Этап 1. рН < 7,37, т. е. это ацидоз.

Этап 2. $p\text{CO}_2$ и HCO_3^- снижены, т. е. это метаболический ацидоз (при дыхательном ацидозе оба параметра увеличены).

Этап 3. Определяем компенсаторное снижение $p\text{CO}_2$ — $1,5 \times 9 + 8 = 21,5$. А реальное значение $p\text{CO}_2$ 17, т. е. нарушение КЩР смешанное; есть сопутствующий первичный дыхательный алкалоз (что характерно для начинающегося сепсиса).

Этап 4. (корреляция с клинической картиной). У пациента метаболический ацидоз вследствие кетоацидоза и сопутствующий дыхательный алкалоз вследствие начинающегося сепсиса.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ АЦИДОЗ С УВЕЛИЧЕННЫМ АИ (НОРМОХЛОРЕМИЧЕСКИЙ АЦИДОЗ)

Кетоацидоз. Увеличено образование кетоновых тел (кетокислот). Может возникать как при сахарном диабете, так и при голодании и алкоголизме. Кетоновые тела — группа органических соединений, относящихся к промежуточным продуктам обмена жиров, белков и углеводов. Основной путь синтеза кетоновых тел (кетогенез), который происходит главным образом в печени, — конденсация под действием тиолазы 2 молекул ацетил-КоА, образованного при β -окислении высших жирных кислот или при окислительном декарбоксилировании пирувата. Кетоновые тела используются организмом в качестве источников энергии при ограниченном питании. При полном окислении 1 г кетоновых тел образуется 4 ккал энергии.

Молочнокислый ацидоз (лактат-ацидоз) — характерный признак многих состояний, сочетающихся с гипоксией тканей, и сопровождающийся повышением концентрации молочной кислоты в крови. Молочная кислота — конечный продукт анаэробного гликолиза и гликогенолиза — вырабатывается в организме в количестве 1 мэкв/(кг · ч) (в норме при мышечном покое). Нормальный уровень лактата в сыворотке крови составляет 2 мэкв/л и менее, но при больших физических нагрузках содержание молочной кислоты в крови может достигать 4 мэкв/л. Большая часть лактата метаболизируется печенью, являясь субстратом глюконеогенеза (кроме того, молочная кислота поглощается сердечной мышцей, где используется как энергетический материал). Печень способна перерабатывать в 10 раз больше лактата, чем его образуется в норме.

Основные причины, вызывающие развитие лактат-ацидоза:

Клинический шок (кардиогенный или септический) — главная причина молочнокислого ацидоза. Однако при сепсисе возможно развитие лактат-ацидоза и без артериальной гипотензии и других клинических симптомов шока. Гиперлактацидемия при шоке возникает из-за интенсивного образования молочной кислоты и снижения способности печени к ее переработке, т.е. способности превращать лактат в глюкозу и гликоген. Угнетение метаболизма лактата может быть результатом нарушения печеночного кровообращения вследствие падения АД при шоке. Накопление в крови молочной кислоты при любом виде шока считается плохим прогностическим признаком.

Заболевания печени также могут приводить к молочнокислому ацидозу, в первую очередь из-за нарушения способности печени к утилизации лактата. Однако даже при тяжелой патологии печени лактат-ацидоз не развивается вплоть до появления артериальной гипотензии или других клинических признаков шока.

Анемии любого генеза и почечная недостаточность также приводят к развитию молочнокислого ацидоза.

Дефицит тиамин может способствовать возникновению лактат-ацидоза вследствие угнетения окисления пирувата в митохондриях. Тиамин — предшественник тиаминпирофосфата, выполняющего функцию кофермента для ряда ферментов, ката-

лизирующих реакции как неокислительного, так и окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, в частности пировиноградной кислоты. Дефицит тиамина приводит к блокированию превращения пирувата в ацетилированную форму кофермента А (ацетил-КоА) и направляет метаболизм пировиноградной кислоты по пути образования лактата. Лактат-ацидоз, обусловленный недостатком тиамина, развивается при отсутствии серьезных расстройств со стороны сердечно-сосудистой системы; возможна коррекция такого ацидоза введением тиамина. Дефицит тиамина отмечен у больных в критических состояниях, это следует принимать во внимание в каждом случае молочнокислого ацидоза у пациентов со стабильной гемодинамикой, а также при содержании лактата в крови, превышающем уровень, соответствующий выраженности сердечно-сосудистой патологии.

Алкалоз. Повышенная концентрация лактата в крови может быть обусловлена и выраженным алкалозом (метаболическим или дыхательным). Предполагаемый механизм, приводящий к увеличению продукции молочной кислоты, связан с повышенной активностью рН-зависимых ферментов, катализирующих реакции гликолиза. Обычно печень оказывается способной адекватно реагировать на повышение образования лактата при алкалозе, так что уровень молочной кислоты в сыворотке крови возрастает только при тяжелых формах алкалоза (рН сыворотки более 7,6). Следует помнить, что при нарушениях функции печени, обусловленных расстройствами печеночного кровотока, индуцированная алкалозом повышенная продукция лактата может иметь важное значение во время внутривенных вливаний щелочных растворов.

D-лактат-ацидоз. Как известно, молочная кислота — оптически активное соединение. В мышцах человека и животных найдена L-молочная кислота (лево-вращающий изомер), а ее право-вращающий изомер образуется в результате действия ферментов микроорганизмов, расщепляющих глюкозу в кишечнике. D-молочную кислоту могут вырабатывать несколько видов бактерий, например *Bacteroides fragilis*, и некоторые грамотрицательные кишечные аэробы, такие, как *Escherichia coli*. D-лактат-ацидоз чаще отмечают у больных с обширной резекцией тонкой кишки, кишечными анастомозами, а также у лиц с выраженным ожире-

нием. При измерении содержания лактата в крови стандартными лабораторными методами определяют только его левовращающий изомер. Для правильной диагностики необходимо иметь специальные тест-системы для выявления D-молочной кислоты. Такие исследования обычно проводят в хорошо оснащенных клинических биохимических лабораториях.

Лекарственные препараты и молочная кислота. К лекарственным препаратам, наиболее часто вызывающим молочнокислый ацидоз, относят адреналин, натрия нитропруссид и бигуаниды.

Почечная недостаточность. Накопление органических и неорганических анионов, связанное со снижением скорости клубочковой фильтрации, приводит к увеличению АИ при тяжелой почечной недостаточности.

Отравления алкоголем, метанолом и этиленгликолем могут привести к накоплению органических кислот (например, молочной кислоты). При отравлении салицилатами метаболический ацидоз развивается в ответ на первичный дыхательный алкалоз (см. ниже).

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ АЦИДОЗ С НОРМАЛЬНЫМ АИ (ГИПЕРХЛОРЕМИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ АЦИДОЗ)

Проксимальный канальцевый ацидоз характеризуется сниженной проксимальной канальцевой реабсорбцией бикарбоната, приводящей к чрезмерной экскреции бикарбоната с мочой. К причинам относят цистиноз, системную красную волчанку, множественную миелому, отравление тяжелыми металлами, гепатолентикулярную дегенерацию и нефротический синдром.

Дистальный канальцевый ацидоз. К причинам относят отравления тяжелыми металлами, прием амфотерицина В, системную красную волчанку, обструктивную уропатию, синдром Шегрена и другие состояния, сопровождающиеся гиперглобулинемией.

Гиперкалиемический почечный канальцевый ацидоз. Гиперкалиемия, в частности сочетающаяся с гипоренинемическим гипоальдостеронизмом, характеризуется снижением экскреции аммиака, уменьшением образования бикарбоната и неспособностью буферивать нелетучие кислоты.

Ингибирование карбоангидразы. Диуретик ацетазоламид (диакарб) и мафенид (местно при лечении ожогов) ингибируют карбоангидразу и уменьшают проксимальную канальцевую реабсорбцию бикарбоната.

Потеря бикарбоната через ЖКТ (диарея, фистула поджелудочной железы, уретеросигмостомия).

Применение минеральной кислоты. Гиперхлоремический метаболический ацидоз развивается при назначении соляной кислоты или любых ее метаболических предшественников, включая хлорид аммония, гидрохлорид аргинина, хлорид кальция (только при пероральном приеме).

Клиническая картина метаболического ацидоза обычно связана с основным заболеванием. Ключ к диагностике метаболического ацидоза — дыхание Куссмауля. При рН крови менее 7,2 может возникать снижение сердечного выброса. Ацидоз может сопровождаться резистентностью к сосудосуживающему действию катехоламинов (приводящей к развитию артериальной гипотензии) и инсулина (что требует увеличения дозы инсулина при прогрессировании диабетического кетоацидоза). Диагноз ставят по результатам исследования газов артериальной крови (снижение уровня бикарбоната с компенсаторным снижением $p\text{CO}_2$ крови) и электролитов сыворотки (непостоянные величины содержания хлорида в зависимости от того, сочетается ли ацидоз с нормальным или увеличенным АИ).

Дыхательный ацидоз

Дыхательный ацидоз характеризуется первичным повышением $p\text{CO}_2$ и компенсаторным повышением HCO_3^- . Таким образом, физиологическая реакция на первичный дыхательный ацидоз — вторичный метаболический алкалоз. Как правило, дыхательный ацидоз наблюдают при бронхообструктивных заболеваниях (классический пример — приступ бронхиальной астмы). Фактически любое нарушение, угнетающее функцию легких и клиренс CO_2 , приводит к развитию дыхательного ацидоза:

Первичное поражение легких (альвеолярно-капиллярная дисфункция) может привести к задержке CO_2 (обычно в качестве позднего проявления).

Нервно-мышечные поражения. Любая патология дыхательной мускулатуры, приводящая к снижению вентиляции (например, *myasthenia gravis*), может вызывать задержку CO_2 .

Патология ЦНС. Любое тяжелое повреждение ствола мозга может сочетаться со снижением вентиляционной способности и задержкой CO_2 .

Лекарственно-обусловленная гиповентиляция. Любой препарат, вызывающий выраженное угнетение ЦНС или функции мышц, может сочетаться с дыхательным ацидозом.

Важные отличия от метаболического ацидоза — отсутствие дыхания Куссмауля и бесполезность назначения бикарбоната натрия. Концентрация бикарбоната натрия при дыхательном ацидозе повышена (при метаболическом снижена), поэтому его назначение приводит к быстрому развитию метаболического алкалоза (см. ниже). Остальные признаки дыхательного ацидоза (снижение сердечного выброса, чувствительности к катехоламинам и инсулину) аналогичны таковым при метаболическом ацидозе.

Клинический пример. В приемный покой поступил пациент с хроническим обструктивным заболеванием легких (pH 7,34, pCO_2 55 мм рт. ст., HCO_3^- 29 мэкв/л).

Этап 1. $\text{pH} < 7,37$, т. е. это ацидоз.

Этап 2. pCO_2 и HCO_3^- увеличены, т. е. это дыхательный ацидоз.

Этап 3. Расчет нормальной компенсаторной реакции. Увеличение HCO_3^- должно равняться: $4 \times \text{pCO}_2 / 10 = 4 \times 15 / 10 = 6$. Таким образом, ожидаемая величина $\text{HCO}_3^- = 24 + 6 = 30$, а реальная — 29, что практически соответствует расчетной. Следовательно, это простое нарушение КЩР.

Этап 4. (корреляция с клинической картиной). У пациента хронический дыхательный ацидоз вследствие гиповентиляции.

Метаболический алкалоз

Метаболический алкалоз характеризуется первичным повышением уровня бикарбоната с компенсаторным повышением pCO_2 крови. Таким образом, физиологическая реакция на первичный метаболический алкалоз — вторичный дыхательный ацидоз, клинически проявляющийся урежением и ослаблением дыхания.

Метаболический алкалоз — наиболее распространенная форма нарушений КЩР у больных, находящихся в отделениях интенсивной терапии, вероятно, из-за широкого и часто необоснованного применения диуретиков. В последние годы метаболическому алкалозу придают значительно большее значение, поскольку это состояние трудно поддается коррекции; в частности, в случаях с повышением рН сыворотки крови более 7,55 летальность может достигать 40%.

Сложность проблемы метаболического алкалоза связана не только с различными расстройствами, возникающими на его фоне, но и со способностью алкалоза поддерживать самого себя, несмотря на устранение некоторых причин, его вызвавших. В основном это обусловлено истощением запасов хлоридов, что ограничивает экскрецию бикарбоната почками путем усиления реабсорбции и угнетения его секреции в почечных канальцах.

Различают два основных типа метаболического алкалоза, при котором почки задерживают бикарбонат. Они отличаются по реакции на терапию хлоридом натрия, а также по уровню хлоридов в моче.

Хлоридчувствительный метаболический алкалоз. Хлориды теряются в большей степени, чем натрий (неважно, каким образом — через ЖКТ или мочевыводящие пути). Концентрация хлоридов в моче менее 10 ммоль/л. Потеря хлоридов приводит к задержке натрия и соответственно бикарбоната почками. Этот тип алкалоза хорошо поддается лечению хлоридом натрия. Причинами данного типа алкалоза могут выступать потери хлоридов через ЖКТ (рвота, диарея) и мочевыводящие пути (например, прием диуретиков).

Хлоридрезистентный метаболический алкалоз развивается в результате прямой стимуляции почек к задержке бикарбоната независимо от потребления и потери электролитов. Концентрация хлоридов в моче — более 10 ммоль/л. Этот тип алкалоза не поддается лечению хлоридом натрия. К причинам данного типа алкалоза относят гиперкортицизм любой этиологии, применение щелочей в виде бикарбоната натрия (например, при кардиореанимации) или в виде органических ионов (например, лактата, цитрата и ацетата, метаболизирующих в бикарбонат в печени), а также синдромы Барттера и Гительмана.

Синдром Барттера — наследственное заболевание с выраженным снижением АД и объема циркулирующей крови из-за потери солей с почками (дополнительный компонент артериальной гипотензии — резистентность рецепторов к ангиотензину II), гипокалиемическим алкалозом, гиперкальциурией и нормальным содержанием магния в сыворотке. Последние две особенности отличают пациентов с этим синдромом от пациентов с синдромом Гительмана, у которых в дополнение к гипокалиемическому алкалозу и потере солей обнаруживают гипокальциурию и гипомагниемия. Пациенты тяжело больны с рождения при обоих синдромах, при длительном течении часто развивается нефрокальциноз, ведущий к почечной недостаточности. Гипокалиемия приводит к увеличению продукции простагландинов в почках (которые в свою очередь увеличивают продукцию альдостерона как прямо, так и опосредованно через ренин-ангиотензиновую систему). Несмотря на это, гипокалиемия *per se* подавляет выработку альдостерона, результирующий эффект при синдромах Барттера и Гительмана — незначительный гиперальдостеронизм (биологический смысл — поддержание нормального АД). Чувствительность рецепторов к ангиотензину II восстанавливается при адекватной инфузионной терапии, назначении ингибиторов синтеза простагландинов (нестероидных противовоспалительных средств) или пропранолола. Таким образом, резистентность к ангиотензину II — вторичный феномен при синдромах Барттера и Гительмана.

Клиническая картина. Метаболический алкалоз можно заподозрить по редкому и поверхностному дыханию, изменениям в периферической и центральной нервной системе, напоминающим таковые при гипокальциемии (нарушения сознания различной степени выраженности, парестезии, предрасположенность к судорогам) и увеличению сердечного выброса.

Дыхательный алкалоз

Дыхательный алкалоз характеризуется первичным снижением уровня $p\text{CO}_2$ вследствие альвеолярной гипервентиляции и компенсаторным снижением бикарбоната. Как правило, он имеет вторичный характер (развиваясь в ответ на метаболи-

ческий ацидоз). Любое нарушение, связанное с центральной или периферической стимуляцией дыхательного центра, приводит к развитию первичного дыхательного алкалоза. К причинам дыхательного алкалоза относят центральную стимуляцию дыхательного центра (истерия, начинающийся граммотрицательный сепсис, отравление салицилатами, патология ЦНС), периферическую стимуляцию (любое состояние, сопровождающееся гипоксией, например тромбоэмболия легочной артерии) или другие причины (печеночная недостаточность, неконтролируемая гипервентиляция при ИВЛ, гипертиреоз, беременность).

Клиническая картина в целом аналогична таковой при метаболическом алкалозе.

Клинический пример. В приемный покой поступила 30-летняя беременная женщина с тошнотой и рвотой (pH 7,55, pCO_2 25 мм рт.ст., HCO_3^- 22 мэкв/л).

Этап 1. $\text{pH} > 7,44$, т. е. это алкалоз.

Этап 2. pCO_2 и HCO_3^- снижены, т. е. это дыхательный алкалоз.

Этап 3. Расчет ожидаемого снижения HCO_3^-

$$5 \times \frac{40 - 25}{10} = 7,5.$$

Таким образом, бикарбонат должен снизиться до 16,5 ммоль/л ($24 - 7,5$). Реальное значение бикарбоната 22 ммоль/л, что свидетельствует об относительном метаболическом алкалозе. Таким образом, это смешанное нарушение КЩР.

Этап 4. У пациентки дыхательный алкалоз вследствие беременности и относительный метаболический алкалоз вследствие рвоты.

Диагностика основана на измерении параметров газов артериальной крови, повышении содержания хлоридов сыворотки и снижении уровня свободного ионизированного кальция. Последнее связано с тем, что меньшее количество ионов водорода связывается с белками плазмы, соответственно с ними может связаться большее количество ионизированного кальция.

1.2. БЕЛКИ И СУБСТРАТЫ

Определение содержания общего белка плазмы (сыворотки) крови — элемент комплекса профилактических и лечебных мероприятий уже на начальном этапе оказания медицинской помощи.

Большинство белков плазмы крови синтезировано в гепатоцитах. Катаболизм многих белков плазмы крови происходит в эндотелиальных клетках капилляров и системе функциональных фагоцитов — моноцитов и макрофагов — после поглощения белков путем пиноцитоза. Белки с небольшой молекулярной массой проходят через фильтрационный барьер почечных телец в первичную мочу, из которой их реабсорбируют эпителиальные клетки проксимальных канальцев и катаболизируют до аминокислот.

Содержание белков во внутрисосудистом пространстве в каждый момент времени — результат постоянного равновесия, имеющегося между синтезом и секрецией белков в кровь, поглощением их клетками, процессами катаболизма и экскрецией низкомолекулярных белков с мочой. Кроме того, постоянный обмен белками происходит между внутрисосудистым и внесосудистым пулом внеклеточной жидкости. Поддержание постоянства внутрисосудистого объема крови осуществляет коллоидно-осмотическая система. Постоянство онкотической составляющей осмотического давления в крови обеспечивает альбумин.

Группы белков плазмы крови

Плазма крови содержит смесь белков, различных как по происхождению, так и по их функции. Для многих белков их функции еще не установлены. В сыворотке крови идентифицировано несколько десятков индивидуальных белков, имеющих диагностическое значение. В патологических ситуациях изменяется главным образом не общее содержание белка, а значительно увеличиваются или уменьшаются отдельные его составляющие с появлением в ряде случаев белков, не содержащихся в нормальных условиях.

Компоненты системы свертывания крови и множество пептидных гормонов в функциональном отношении охарактеризованы достаточно хорошо. Только несколько из циркулирующих в крови ферментов имеет здесь реальную физиологическую функцию, большинство же из них попадает в кровоток в результате разрушения клеток. Все белки системы комплемента функционально значимы, как и большая группа белков острой

фазы, содержание которых в ходе воспалительного процесса возрастает на 2 порядка.

Большую функциональную группу белков плазмы крови составляют транспортные белки с более или менее выраженной специфичностью. Они переносят в кровотоке от клеток к клеткам гидрофобные (водонерастворимые) вещества и соединения — гормоны, метаболиты, витамины, жирные кислоты и их транспортные формы — триглицериды (ТГ) и фосфолипиды, ионы кальция, железа, меди, а также лекарственные препараты. Основным транспортным белком кровотока — альбумин. Связанный с носителем пул биологически активных веществ в крови функционально неактивен. В силу гораздо более высокого сродства клеточных рецепторов к этим веществам при омывании кровью тканей-мишеней равновесие в связывании биологически активных соединений нарушается и их могут связывать клетки со специфическими рецепторами на мембране.

Общий белок

Плазму крови, экссудаты и транссудаты можно использовать в качестве биологического материала. Все они дают сравнимые результаты, хотя из-за присутствия фибриногена уровень общего белка в плазме крови на 2–4 г/л выше, чем в сыворотке. Белок стабилен в сыворотке и плазме крови в течение недели при комнатной температуре, по крайней мере до 2 мес при -20°C . Гемолиз дает ложноположительное увеличение общего белка на 3% на каждый 1 г свободного гемоглобина в 1 л сыворотки крови.

Содержание общего белка у мужчин и женщин в среднем составляет 66–81 г/л. Результаты для мужчин примерно на 1 г/л выше, чем для женщин. При беременности концентрация белка в сыворотке крови заметно уменьшается — с 69 до 61 г/л к моменту родов. Не отмечено различий в концентрации белка сыворотки до и после еды.

Физиологические колебания содержания общего белка в сыворотке крови зависят в большинстве случаев от изменения объема жидкой части крови и в меньшей степени связаны с синтезом или потерей белка. В норме содержание белка в сыворотке

крови одинаково как у вегетарианцев, так и у людей с обычным характером питания, хотя нагрузка белком может увеличить в крови содержание общего белка. Высокая физическая активность способствует только незначительному повышению в крови содержания общего белка.

Гипопротеинемия. Некоторое уменьшение концентрации общего белка в сыворотке крови происходит с возрастом. У новорожденных концентрация белка в сыворотке крови составляет 57 г/л, увеличивается до 60 г/л к 6 мес и достигает уровня у взрослых к 3 годам жизни. У недоношенных детей содержание может быть ниже, чем у родившихся в срок (36–60 г/л). Изменение положения тела дает значимое различие в концентрации белка сыворотки крови. Общий белок сыворотки крови ниже на 4–8 г/л у людей в положении лежа, чем у людей в положении стоя. Содержание белка может быть увеличено на 4–8 г/л через несколько часов после физических нагрузок.

Содержание белка в сыворотке крови первоначально зависит от синтеза в печени и потери белков с мочой при заболеваниях почек. Некоторое снижение содержания белка может быть вызвано недостаточным поступлением с пищей, нарушениями пищеварения, всасывания. Хронические заболевания печени также уменьшают уровень общего белка в сыворотке крови. Заболевания почек (гломерулонефрит, нефротический синдром и некоторые заболевания проксимальных канальцев) могут вызывать хроническую потерю белка из сыворотки крови. Когда содержание общего белка в сыворотке крови снижается до 40 г/л, развиваются отеки.

Гиперпротеинемия. Увеличение общего белка в сыворотке крови может быть вызвано явлениями дегидратации или быть результатом накопления иммуноглобулинов; последнее часто наблюдается у пациентов с моноклональной гаммапатией.

На концентрацию белков в плазме крови сильно влияет содержание в плазме крови воды (величина гематокрита). В остальных ситуациях определение общего белка в сыворотке крови не позволяет провести органотопическую диагностику, однако широко используется при скрининге и профилактических осмотрах. Снижение содержания белков в плазме крови далеко не всегда отражает нарушенный белковый обмен.

Методы определения

Идеальным для определения общего белка был бы метод, не зависящий от вида белка. Однако в настоящее время с помощью всех методических приемов определения содержания общего белка в сыворотке крови со значительно большей аналитической чувствительностью и специфичностью устанавливают концентрацию доминирующего вида белка. Кроме того, некоторые белки в крови связаны с липидами и углеводами, что также накладывает отпечаток на методы их количественного определения. Особенность общего белка как определяемого соединения — его выраженная гетерогенность уже в физиологических условиях, которая становится более выраженной при разных видах патологии.

Наиболее часто используемый для определения общего белка в сыворотке метод основан на биуретовой реакции. В ней ионы меди взаимодействуют с атомами азота пептидной связи белка. Образующийся комплекс реагирует с биуретом (карбамилмочевинной) в сильно щелочной среде (обычно NaOH) с образованием окрашенного в сиреневый цвет продукта конденсации с максимальной абсорбцией при длине волны 450 нм.

Метод Лоури и соавт., широко используемый для количественного определения белка, может быть применен и для анализа общего белка сыворотки крови. В этом методе белок в пробе предварительно обрабатывают щелочным раствором меди. После добавления фенолового реактива при связывании медно-белкового комплекса с тирозином и триптофаном в цепях белковых молекул образуется хромоген с максимумом абсорбции при длине волны 745–750 нм. Цистин, цистеин и гистидин также реагируют в этих условиях, но в меньшей степени.

Многие белки сыворотки и плазмы крови определяют при использовании более специфичных методов (реакция Ag-AT) или выражают в форме каталитической концентрации. Чаще всего в диагностике используют количественные параметры белков и существенно реже определяют нарушение их качественных параметров. Это относится к генетическим нарушениям первичной структуры белковых молекул.

Электрофорез (ЭФ) — наиболее распространенный метод оценки качественного состава белков сыворотки крови. Обладая разным зарядом, белки в буферном растворе движутся в электрическом поле к аноду со скоростью, пропорциональной величине их отрицательного заряда. Использование одного из носителей, чаще ацетата целлюлозы, применение буферной системы с постоянными рН и ионной силой, оптимизация параметров электрического поля и времени разгонки позволяют стандартизировать процедуру ЭФ и получать воспроизводимые результаты.

Альбумины и глобулины

Окрашивание белков сыворотки крови и последующая процедура денситометрии позволяют получить 5 фракций белков, именуемых по скорости их движения как альбумин, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины (рис. 1.4). Каждая из фракций глобулинов содержит несколько специфических белков. Процедура ЭФ позволяет установить:

- снижение содержания альбумина;
- увеличение одной или нескольких фракций глобулинов;
- появление фракции глобулинов, отсутствующих в крови здорового человека.

Фракция альбумина гомогенна, перед ней иногда можно обнаружить белок, связывающий тиреоидные гормоны. Во фракции α -глобулинов доминирует α_1 -антитрипсин — ингибитор протеиназ. Фракцию α_2 -глобулинов формируют в основном α_2 -макроглобулин и гаптоглобин. β -Глобулины часто представлены 2 нечеткими пиками, которые формируют трансферрин и апоВ-100; второй пик содержит в основном компонент комплемента С3. Во фракции γ -глобулинов (иммуноглобулинов) отдельные белковые цепи — это компоненты β -глобулинов.

Снижение интенсивности окраски всех фракций белка при ЭФ может указывать на нарушение всасывания белков в тонкой кишке или выраженное разведение плазмы крови. Противоположную картину можно наблюдать при выраженном сгущении крови при существенном увеличении показателя гематокрита. Развитие синдрома воспаления вне зависимости от его этиологии будет сопровождаться выраженным увеличением в крови бел-

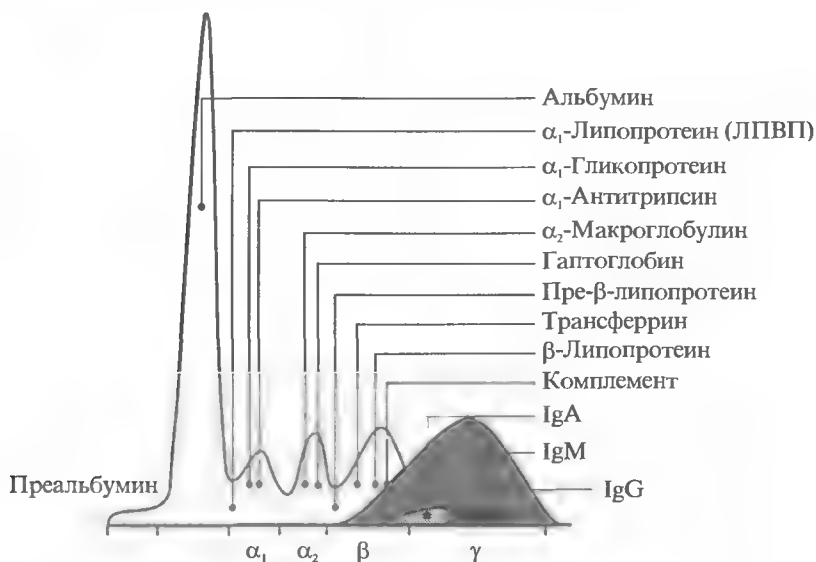


Рис. 1.4. Электрофореграмма белков сыворотки крови.

ков острой фазы и увеличением фракции α_1 - и α_2 -глобулинов. В наибольшей степени при этом возрастает в крови содержание С-реактивного белка, ингибитора протеиназ и амилоида А.

При хроническом воспалительном процессе в крови увеличивается содержание фракции γ -глобулинов. В условиях обострения хронического процесса возможно одновременное увеличение в крови содержания фракций γ -, α_1 - и α_2 -глобулинов. При снижении синтетической функции гепатоцитов в крови понижается содержание альбумина, α_1 - и α_2 -глобулинов при существенном увеличении фракции γ -глобулинов. Напротив, в условиях лечения цитостатиками фракция γ -глобулинов может быть существенно снижена или даже отсутствовать.

При нефротическом синдроме изменения во фракциях белка зависят от особенностей патологического процесса. В начальной стадии патологический процесс может проявляться только выраженной гипоальбуминемией. Позднее через фильтрационный барьер почечных телец проходят также α_1 - и α_2 -глобулины. При выраженном необратимом повреждении мембраны в мочу могут выходить и γ -глобулины.

БИЛИРУБИН

Билирубин — тетрапиррольный пигмент с молекулярной формулой $C_{33}H_{56}N_4O_6$ и молекулярной массой 584,65 Д. В организме билирубин образуется в процессе катаболизма геминовой части гемоглобина (протопорфирина IX) эритроцитов, закончивших свой жизненный цикл. Гемоглобин подвергается разрушению главным образом в клетках РЭС селезенки и печени. Таким же путем билирубин образуется в клетках РЭС при катаболизме других гемсодержащих белков (миоглобин, каталаза, пероксидаза), правда, в значительно меньшем количестве. При резорбции гематомы билирубин формируется в месте кровоизлияния. При среднем времени жизни эритроцитов 120 дней в сутки в организме формируется билирубин в количестве $3,8 \pm 0,6$ мг/кг массы тела.

Билирубин — неполярная молекула; он почти не растворяется в воде, но хорошо растворим в щелочной среде благодаря ионизации карбоксильных групп и возрастающей полярности. В сыворотке крови стабильность билирубина в водной среде объясняется связыванием с альбумином.

Билирубин, попадая из клеток РЭС в сыворотку крови, электростатически взаимодействует с альбумином и транспортируется в печень. Эта фракция носит название неконъюгированного (свободного) билирубина. Гепатоциты активно захватывают билирубин из крови — за 18 мин из крови исчезает 50% экзогенного билирубина. Поглощение гепатоцитами из крови неконъюгированного билирубина — активный процесс, в котором принимают участие лиганд и специфический белок протеин Z.

В гепатоцитах карбоксильные группы билирубина взаимодействуют с гидроксильными группами углеводов (глюкуроновые кислоты), формируя эфиры, преимущественно диглюкурониды билирубина (конъюгированный билирубин). Образование эфирной связи между билирубином и 2 молекулами глюкуроновой кислоты катализирует уридиндифосфат-глюкуронилтрансфераза (КФ 2.4.1.17). Так же образуются и другие конъюгаты билирубина (сульфаты, фосфаты, гликозиды, ксилозиды), но их физиологическое значение остается неясным. Полярные моле-

кулы конъюгированного (связанного) билирубина растворимы в воде.

Конъюгированный билирубин экскретируется с желчью, накапливается в желчном пузыре, затем выделяется в тонкую кишку, где при действии микробной флоры восстанавливается с образованием бесцветных пирролов (уробилиногенов). Большинство образованных уробилиногенов окисляется в уробилины и покидает организм с калом или мочой. Некоторое количество уробилиногенов может быть абсорбировано в кишечнике и по портальной системе поступает в печень. Небольшую часть конъюгатов билирубина в толстой кишке гидролизует бактериальная β -глюкуронидаза с образованием неконъюгированного билирубина, который также может поступать по портальной системе в печень. Когда уровень конъюгированного билирубина в сыворотке крови достаточно высок, он проходит через фильтрационный барьер почечных телец и экскретируется с мочой. Неконъюгированный билирубин, прочно связанный с альбумином в сыворотке крови, не проходит через фильтрационный барьер почечных телец.

В норме конъюгированный (прямой, связанный) билирубин составляет менее $1/5$ содержания пигмента в сыворотке крови, неконъюгированный (непрямой, свободный) — $4/5$.

Клиническое значение гипербилирубинемии

Содержание общего билирубина в сыворотке крови в норме не превышает $15 \text{ мг\%}$ ($25,7 \text{ мкмоль/л}$), среднее значение — $7 \text{ мг\%}$ (12 мкмоль/л), при более высоких значениях используют термин «гипербилирубинемия». Как у мальчиков, так и у девочек содержание билирубина увеличивается после пубертатного возраста, снижается после 30 лет и далее остается стабильным. Небольшие половые различия в уровне билирубина в сыворотке крови практического значения не имеют. Содержание билирубина в крови не превышает 25 мкмоль/л в норме, наличие в сыворотке крови 50 мкмоль/л билирубина можно определить визуально (незначительная желтуха), а при повышении содержания билирубина до 100 мкмоль/л уже ясно выражена желтушность кожных покровов.

Считается, что гипербилирубинемия имеет печеночное происхождение, если более 80% общего билирубина составляет конъюгированный билирубин. Гипербилирубинемия рассматривают как гемолитическую, если более 80% общего билирубина представлено неконъюгированным пигментом.

Умеренное повышение содержания в крови неконъюгированного (непрямого, свободного) билирубина происходит при повышенном образовании из гемоглобина при усиленном разрушении эритроцитов в селезенке; конкурентном вытеснении неконъюгированного билирубина из связи с альбумином (салицилаты, желчные кислоты, сульфаниламиды, тетрациклины); нарушении захвата гепатоцитами неконъюгированного билирубина из крови; недостаточной активности уридиндифосфат-глюкуронилтрансферазы гепатоцитов, которая осуществляет конъюгирование билирубина. Различают наследственную и приобретенную недостаточность глюкуронилтрансферазы, к первой относят, в частности, синдром Криглера-Найяра.

Гемолитическая гипербилирубинемия обычно достигает 75 мкмоль/л. Длительное умеренное повышение содержания неконъюгированного билирубина в крови отмечают при сердечной недостаточности. Неконъюгированный билирубин особенно токсичен для нервных клеток; связывание с альбумином делает его менее токсичным. Для определения связывающей способности альбумина по отношению к билирубину используют хроматографию на сефадексе. Для прояснения специальных случаев патологии применяют методы электрофоретического определения билирубина, обнаруживая связывание пигмента с отдельными фракциями белка. Накопление в крови конъюгированного билирубина обусловлено двумя факторами: снижением активности экскреции пигмента при внутриклеточном холестазах; холестатическими процессами с гипертензией в желчных протоках и затруднением выхода пигмента из гепатоцитов против градиента концентрации (внепеченочный холестаз). В обеих ситуациях конъюгированный билирубин оказывается в крови. Желтуху классифицируют как острую гепатоцеллюлярную (гепатит), хроническую гепатоцеллюлярную (цирроз), обструкцию желчных ходов, внепеченочный холестаз. При гепатоцеллюлярном поражении конъюгированная фракция

составляет меньшую долю общего билирубина, чем при внеклеточном блоке. Повышение содержания билирубина в крови при гепатотоксическом влиянии фармакологических препаратов — как правило, проявление легкого внутрипеченочного холестаза, а не аналитической интерференции лекарственных препаратов. Повышение в крови содержания конъюгированного билирубина характерно для острого вирусного гепатита, лекарственного и токсического гепатита, метастазов в печень.

Высокое содержание билирубина в крови новорожденных с гемолитической желтухой связано со значительным риском неврологических осложнений. Билирубин способен откладываться в тканях, в том числе в коже, при этом содержание его в разных участках кожи неодинаково.

Новые аналитические методы не поколебали уверенность в том, что определение повышенной концентрации неконъюгированного билирубина отражает деструкцию эритроцитов, а конъюгированный билирубин доминирует при обструктивных процессах в печени.

Методы определения

Несмотря на длительное применение исследования билирубина в клинической практике, до настоящего времени полностью не решены аналитические проблемы исследования пигмента. Ряд серьезных трудностей обусловлен характерными свойствами пигмента — нерастворимостью в воде и нестабильностью соединения. Наличие двух форм билирубина в сыворотке крови затрудняет стандартизацию определения общего билирубина. Определение как прямого, так и общего билирубина не вполне специфично, соотношение свободный/конъюгированный билирубин недостаточно точно, так как большинство диазометодов (см. ниже) значительно завышает уровень конъюгированного билирубина. Это следует принимать во внимание, поскольку соотношение прямого и непрямого билирубина используют в дифференциальной диагностике гипербилирубинемии.

Содержание общего билирубина в сыворотке крови можно определить методом прямой спектрофотометрии при длине волны 450–460 нм. В условиях прямой спектрофотометрии получаемые

оптические плотности необходимо скорректировать на величину интерференции гемоглобина. С этой целью созданы двухволновые спектрофотометры (билирубинометры), измеряющие оптическую плотность при длине волны 454 и 540 нм. Невозможность раздельного определения свободного и конъюгированного билирубина в пробе затрудняет трактовку результатов. Другие хромогены сыворотки крови (каротин и ксантофил) также оказывают влияние на результаты определения.

Стандартизация билирубинометров представляет большие трудности, поскольку спектр связанного с альбумином пигмента отличается от свободного билирубина в стандарте. Из этого следует, что стандарт при прямой спектрофотометрии билирубина должен быть приготовлен с использованием альбумина человека. Метод прямой спектрофотометрии применяют для оценки гипербилирубинемии у младенцев с гемолитической желтухой новорожденных и определения содержания пигмента в околоплодных водах с целью пренатальной диагностики этого заболевания.

Необходимость оценки гипербилирубинемии при гемолитической желтухе новорожденных стимулировала создание новых способов диагностики, включая методы оценки цвета кожи. Чрескожная оценка гипербилирубинемии основана на отражательной спектрофотометрии и позволяет получить только количественные данные об уровне пигмента.

Наиболее широко используемые методы определения билирубина основаны на его взаимодействии с диазореагентом (реактивом Эрлиха). Реакция взаимодействия диазотированной сульфаниловой кислоты с углеродным атомом метиленовой группы билирубина протекает в два этапа, на каждом образуются изомеры азодипиррола, спектры их абсорбции практически идентичны с максимумом при длине волны 530 нм. Для прохождения второго этапа необходим избыток сульфаниловой кислоты. В прямую реакцию с диазореактивом Эрлиха вступает только растворимый, конъюгированный (прямой) билирубин. Для определения уровня общего билирубина необходимо добавить в реакционную среду «ускоритель», способствующий растворению неконъюгированного билирубина и/или отщеплению его от молекулы альбумина. В сумме эти реакции дают представление о содержании

в сыворотке крови общего, конъюгированного и неконъюгированного (прямого и непрямого) билирубина.

Широкое распространение получил метод Ендрассика–Грофа. В этом методе в качестве «освободителя» билирубина используют смесь кофеина и бензоата натрия в ацетатном буфере. Реакция протекает при pH 6,5, но абсорбцию хромогена измеряют при pH 13,0 после добавления щелочи. В щелочной среде азодипиррол имеет максимум абсорбции при длине волны 600 нм. Преимущества метода Ендрассика–Грофа — более короткое время реакции (1 мин для определения прямого и 10 мин для определения общего билирубина), отсутствие преципитации белков, высокая чувствительность и воспроизводимость. Предложенные впоследствии модификации включали замену кофеина на дифиллин и добавление в реакционную смесь аскорбиновой кислоты и йодида калия для нейтрализации избытка диазореагента.

Ферментативное определение билирубина основано на его окислении билирубиноксидазой, выделенной из грибов *Myrothecium verrucaria*. Билирубиноксидаза катализирует окисление билирубина в бесцветный биливердин, при этом при длине волны 460 нм исчезает абсорбция, свойственная билирубину. Предложенный метод позволяет определить не только уровень общего билирубина, но и его фракций. Определение фракций билирубина основано на разном сродстве фермента к ним при различном pH в присутствии или отсутствии анионного детергента додецилсульфата натрия или холата натрия. Метод более специфичен, чем метод Ендрассика–Грофа.

Возможно определение неконъюгированного билирубина и другим методом ферментативного окисления. Пероксидазу добавляют к пробе вместе с H_2O_2 , при этом билирубин окисляется в бесцветный продукт с одновременным падением оптической плотности билирубина при длине волны 460 нм; метод нашел применение при исследовании билирубина в крови новорожденных.

Билирубин слабо флюоресцирует в водных растворах, но в комплексе с альбумином эффективность флюоресценции возрастает, что позволяет определять связанный с белком билирубин. Возбуждение комплекса билирубин–альбумин происходит

при длине волны 430 нм, испускание — при 520 нм. На этом принципе работают гематофлюориметры; прибор позволяет оценить в капле крови уровень связанного с белком билирубина, а после обработки детергентом — и уровень общего билирубина. Преимущества метода — возможность использования микропроб крови, хорошая воспроизводимость и корреляция с методом Энд-рассика-Грофа.

В настоящее время все большее распространение, особенно при экспресс-диагностике, получает определение билирубина методами «сухой химии». При нанесении капли крови на полоску реактивы вступают в реакцию, формируя те же азопиррольные производные. Оценку результатов реакции проводят методом отражательной спектрофотометрии при длине волны 560 нм. Методы «сухой химии» часто используют для определения билирубина в моче.

КРЕАТИНИН

Креатинин формируется в процессе спонтанного и необратимого превращения креатина. Синтез креатина — двухступенчатый процесс, происходящий в почках, эпителии тонкой кишки, поджелудочной железе и, возможно, в печени. Образование креатинина в организме — величина постоянная — около 2% креатина превращается в креатинин в течение 24 ч. Образование креатинина зависит от массы мышц и в меньшей степени от массы тела. Оно не меняется при сепсисе, травмах, лихорадке, не зависит от степени гидратации организма, повышенного потребления белка, что, однако, может повысить экскрецию креатинина в пределах 10%.

Свободный креатинин — единственный продукт катаболизма креатина, не участвующий в метаболизме. Креатинин присутствует в сыворотке крови, поте, желчи, содержимом кишечника, он преодолевает гематоэнцефалический барьер и появляется в спинномозговой жидкости. Креатинин фильтруется через базальную мембрану гломерул и в норме не подвержен реабсорбции в тубулярном отделе нефрона. В то же время в условиях повышенной концентрации креатинина в крови часть его активно экскретируют клетки тубулярного эпителия. Уровень

креатинина в крови определен его продукцией и элиминацией через фильтрационный барьер почечных телец, т.е. клиренсом креатинина.

Клиническое значение

В нормальном состоянии образование креатинина и его элиминация эквивалентны. В условиях острой почечной недостаточности при значительном падении уровня гломерулярной фильтрации концентрация креатинина в первые дни может быть в пределах нормы и не отражать нарушение функции почек.

Повышение уровня креатинина и мочевины в крови — признак почечной недостаточности. В то же время определение содержания креатинина — более надежный тест, так как повышение концентрации его в крови происходит раньше, чем повышение концентрации мочевины. Образование креатинина не связано с метаболизмом экзогенного белка, в то время как мочевина — основная катаболическая форма белка пищи. Мочевина образуется в печени, фильтруется гломерулярным фильтром и активно реабсорбируется в тубулярной части нефрона, поэтому содержание мочевины в крови зависит не только от нефрогенных факторов. Лихорадка, олигурия, дегидратация приводят к увеличению концентрации мочевины в крови. В свою очередь малобелковая диета и полиурия снижают уровень мочевины крови, не оказывая влияния на содержание креатинина.

Креатинин в моче исследуют главным образом для учета экскреции многих физиологически значимых соединений. Исследование экскреции с мочой гормонов, ферментов и метаболитов во многих случаях составляет основу диагностического процесса. Учитывая, что креатинин не встречает препятствия при экскреции, предложено проводить расчет экскреции анализируемого компонента на 1 мг экскретируемого с мочой креатинина. Такой подход верен только при учете экскреции исследуемых веществ в короткие промежутки времени (после криза или при проведении функциональных тестов). Это в полной мере относится к соотношению белок мочи/креатинин, амилаза/креатинин мочи, отношению экскреции стероидов и катехоламинов/креатинин, одновалентным катионам и другим субстратам.

Методы определения

Щелочной пикрат натрия используют как аналитический реагент для определения креатинина с 1886 г. Вначале реакцию использовали для определения креатинина в моче, позже применяли для определения креатинина сыворотки крови после депротеинизации. Однако до сих пор немного известно о механизме реакции и структуре образующихся продуктов. Реакция креатинина с пикриновой кислотой (реакция Яффе) неспецифична. В принципе каждое вещество, имеющее активную метильную группу, может реагировать с пикратом в описанных условиях. Это относится к ацетоацетату, ацетону, β -оксибутирату, билирубину, глюкозе, фруктозе, оксалоацетату, пирувату, мочевой кислоте. Из лекарственных препаратов в реакцию со щелочным пикратом могут вступать аспирин, амитриптилин, ампициллин, аскорбиновая кислота, фуросемид, пропранолол, салициловая кислота, тетрациклин, толбутамид, антибиотики цефалоспоринового ряда. Из антикоагулянтов на результаты определения уровня креатинина оказывают влияние ЭДТА, гепарин, цитрат, оксалат. Это послужило основой многочисленных модификаций, направленных на повышение специфичности метода определения креатинина.

Депротеинизация сыворотки крови кислотой заменена использованием детергентов (додецилсульфат натрия, тритон X-100), что предотвращало преципитацию белков в кислой среде. В реакционную смесь был включен боратный буфер с целью комплексования углеводов и кетокислот, для удаления их из реакционной смеси до взаимодействия с пикратом. Предварительное окисление вызывает обесцвечивание билирубина и некреатининовых хромогенов.

Важный момент реакции Яффе — поддержание pH в реакционной смеси. Даже слабое изменение pH приводит к вариабельности результатов. При pH менее 7,0 реакция Яффе происходит, но повышение pH до 10,0 значительно увеличивает скорость развития окраски, которая достигает максимума при pH 12,5. При более высоком значении pH можно достигнуть полного образования комплекса креатинин–пикрат со сведением неспецифичной реакции хромогенов до минимума.

Проведенными исследованиями показано, что влияние некреатининовых хромогенов зависит от времени добавления пикриновой кислоты, после чего кинетика образования пикратного комплекса с креатинином и другими хромогенами имеет временные различия.

Применение кинетического метода исследования креатинина позволяет в первую очередь избежать фотометрических ошибок, а во вторую — значительно повысить специфичность метода, учитывая различие в кинетике реакции со щелочным пикратом натрия креатинина и интерферирующих субстанций. Кинетическое измерение реакции проводят в тот временной интервал, когда реакция щелочного пикрата с хромогенами оказывается низкой по сравнению с креатинином. Этот принцип используют наиболее часто. Существование «медленных» и «быстрых» хромогенов сыворотки крови привело к предложению регистрировать скорость нарастания абсорбции по истечении 60 с после добавления пикрата. В автоматизированных методах кинетику реакции считают в интервале 20–80 с после добавления пикрата.

Реакция с пикратом — не единственная для определения креатинина. Предложены также метод с 1,4-нафтохинол-2-сульфонатом и метод превращения креатинина в метилгуанидин с последующим определением его в реакции Сакагуши, в которой метилгуанидин реагирует с α -нафтолом и хлоридом натрия с образованием хромогена красного цвета. Эти методы не имеют преимуществ перед пикратом, но нашли применение в отработке реакции на твердой фазе.

Выделяют три группы ферментативных методов определения креатинина. Методы с использованием креатиназы связаны с относительной доступностью фермента, но они завышают низкие концентрации креатинина. Во второй группе методов, основанных на использовании креатиназы, используют сопряженные ферментативные реакции. Скорость изменения абсорбции реакционной смеси при длине волны 340 нм прямо пропорциональна количеству присутствующего в среде креатинина. Эндогенные креатинин и пируват удаляют преинкубацией с соответствующими ферментами. Третья группа ферментативных методов включает комбинированное использование креатиназы и креати-

назы. Реакции приводят к образованию хромогена, имеющего пик абсорбции при длине волны 510 нм. Эндогенное влияние креатина преодолевают выполнением преинкубации сыворотки крови с КК.

В качестве референсных методов определения креатинина предложено использовать газожидкостную и высокоэффективную жидкостную хроматографию. По сравнению с реакцией Яффе референсные методы дают более низкие результаты содержания креатинина как в сыворотке крови, так и в моче.

МОЧЕВАЯ КИСЛОТА

Мочевая кислота — основной продукт катаболизма пуриновых нуклеозидов, входящих в состав нуклеиновых кислот, макроэргических соединений (АТФ, АДФ), АМФ, некоторых витаминов. Мочевая кислота — конечный продукт обмена пуринов лишь у человека и высших обезьян. У остальных млекопитающих мочевая кислота выступает в роли промежуточного продукта их метаболизма. Под влиянием уриказы мочевая кислота окисляется до аллантаина, обладающего большей растворимостью в воде.

Мочевая кислота имеет молекулярную массу 168 Д. Из эндогенных нуклеозидов в организме человека формируется около 500 мг мочевой кислоты в сутки, из поступающих с пищей образуется примерно 200 мг.

Большая часть (75%) мочевой кислоты, поступившей из тканей в кровь, выделяется в дальнейшем с мочой; оставшаяся доля экскретируется с калом. Мочевая кислота проходит через фильтрационный барьер почечных телец, одновременно реабсорбируясь в канальцах. Эпителий проксимальных канальцев способен секретировать мочевую кислоту в мочу, но и в этом случае мочевая кислота реабсорбируется в их дистальных отделах. Около 10% мочевой кислоты, прошедшей через фильтрационный барьер почечных телец или секретированной канальцами, экскретируется с мочой. Повышенную экскрецию мочевой кислоты наблюдают при лейкозе, полицитемии, подагре, гепатите, а также при введении аспирина и кортикостероидов.

Мочевая кислота обладает низкой растворимостью в водных растворах: в 1 л дистиллированной воды удастся растворить 60 мг мочевой кислоты. Вследствие плохой растворимости повышенное содержание мочевой кислоты в крови приводит к отложению ее солей (уратов) в тканях, что сопровождается формированием асептического воспаления и клинического синдрома, именуемого подагрой.

Клиническое значение

Нарушения обмена мочевой кислоты сопровождаются либо повышением (гиперурикемия), либо снижением (гипоурикемия) ее продукции.

ГИПЕРУРИКЕМИЯ

Выраженная и продолжительная гиперурикемия — условие для развития подагры. Патофизиологическая основа заболевания — кристаллизация уратов из насыщенных биологических жидкостей. Болезнь квалифицируют как первичную подагру, если в ее основе лежат врожденные нарушения метаболизма мочевой кислоты (см. ниже). Гиперпродукцию мочевой кислоты, обусловленную наследственным увеличением синтеза пуринов, отмечают у 25% пациентов с гиперурикемией.

Вторичная подагра возникает, если гиперурикемия развивается в результате другого патологического процесса, например усиленного распада лимфоидных клеток при лейкозе и лимфоме при применении цитостатиков. Подагра может быть следствием недостаточности естественных механизмов выделения мочевой кислоты почками. Гиперурикемию можно наблюдать при сахарном диабете, остром алкоголизме, врожденном дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, избыточной продукции лактата. В любых ситуациях сначала происходит поражение суставов.

Кристаллы уратов — нормальный компонент синовиальной жидкости, однако с их накоплением связывают развитие воспалительного процесса в суставах. Достаточно ли повышения концентрации уратов в синовиальной жидкости для развития воспалительного процесса (подагрический артрит), остается неясным. Синовиальная жидкость содержит также гликозаминогликаны в высокой концентрации, которые способствуют солюбилизации

уратов даже в насыщенном растворе. Возможно, что усиленное разрушение гликозаминогликанов или снижение их поступления в полость сустава может способствовать кристаллизации уратов. Не исключено, что снижение рН синовиальной жидкости, обусловленное гиперпродукцией лактата при анаэробном гликолизе лейкоцитов, способствует кристаллизации мочевой кислоты. Полиморфноядерные лейкоциты в полости сустава фагоцитируют выпавшие кристаллы уратов, освобождают биологически активные вещества, которые и инициируют развитие воспалительной реакции. Острые приступы подагры часто связаны с интеркуррентной инфекцией; возможно, микробные токсины способствуют активации воспалительной реакции, приводя в условиях гиперурикемии к кристаллизации уратов в тканях.

Гиперурикемия и подагра взаимосвязаны. Наиболее часто клиническая картина подагры была отмечена у пациентов с высокой концентрацией мочевой кислоты в крови: у 90% пациентов с уровнем мочевой кислоты 80–89 мг/л развилась подагра. Популяционные исследования выявили значимую корреляцию гиперурикемии и подагры с ожирением, атеросклерозом, гипертриглицеридемией и алкоголизмом. Указывается на отчетливую связь гиперурикемии и ИБС.

Гиперурикемия развивается во всех состояниях, при которых усилен обмен нуклеопротеинов. К ним относят миелопролиферативные состояния, ретикулезы, миеломатоз, гемоглобинопатии, пернициозную анемию, инфекционный мононуклеоз, метастазирование опухолей. При хроническом заболевании почек снижение скорости гломерулярной фильтрации и уменьшение числа функционирующих нефронов могут провоцировать гиперурикемию. Снижение тубулярной секреции мочевой кислоты и гиперурикемию отмечают при патологии печени, сахарном диабете, саркоидозе. Ежедневное потребление 100 мл этанола приводит к гиперурикемии и повышенной экскреции мочевой кислоты.

Диета, богатая фруктозой или сахарозой, но не глюкозой, повышает содержание мочевой кислоты в крови здоровых людей, пациентов с ожирением и больных подагрой. Механизм повышения уровня мочевой кислоты в этих ситуациях может быть связан с активацией синтеза мочевой кислоты, снижением ее экскреции с мочой или сочетанием этих факторов. Усиление раз-

рушения АТФ в гепатоцитах при богатой сахарозой диете также способствует повышению в крови уровня мочевой кислоты.

Высокая концентрация мочевой кислоты в моче создает условия для формирования конкрементов в мочевыводящих путях. Длительная гиперурикозурия может лежать в основе формирования мочекислот нефропатии. У пациентов с усиленным катаболизмом нуклеиновых кислот и гиперурикемией может внезапно развиться олигурия или даже анурия. Острое нарушение оттока мочи возникает при отложении большого количества кристаллов уратов в канальцах. Такие же изменения наступают и при подагре: не менее 10–25% пациентов с подагрой имеют камни в почках, образованные из мочевой кислоты, что почти в 1000 раз превышает данные, полученные в популяционном исследовании. У пациентов со вторичной подагрой этот процент выше (40%).

Фармакологические препараты способствуют возникновению гиперурикемии несколькими путями: небольшие дозы салицилатов, гуанетидин, многие диуретики подавляют тубулярную секрецию мочевой кислоты. Цитотоксические препараты и радиоизлучение, разрушающие ткань опухоли, приводят к гибели клеток и высвобождению большого количества нуклеопротеинов, которые катаболизируются в мочевую кислоту. Гиперурикемия может возникнуть также при интенсивном лечении глюкокортикоидами и большими дозами аспирина.

ГИПОУРИКЕМИЯ

В ряде клинических ситуаций приходится встречаться с гипоурикемией [содержание мочевой кислоты в крови ниже 0,12 ммоль/л (2 мг%)]. Это может быть связано с недостаточностью ксантиноксидазы, другими (более редкими) врожденными нарушениями метаболизма (см. ниже), дефектом механизма реабсорбции мочевой кислоты в канальцах, влиянием препаратов, способствующих экскреции мочевой кислоты с мочой. Пониженный уровень мочевой кислоты в сыворотке крови отмечают при гепатолентикулярной дегенерации и синдроме Фанкони.

ВРОЖДЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ПУРИНОВ

К врожденным нарушениям обмена пуринов относят недостаточность гипоксантинфосфорибозилтрансферазы, аденинфосфорибозилтрансферазы, ксантиноксидазы, аденилосукцинатлиа-

зы, миоаденилатдезаминазы, аденозиндезаминазы и пуриннуклеозидфосфорилазы, а также повышение активности фосфорибозилпирофосфатсинтетазы (табл. 1.3).

Таблица 1.3. Врожденные нарушения пуринового метаболизма

Фермент	Активность	Наследование	Клиническая картина
Гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза	Отсутствие	Х	Членовредительство, хореоатетоз, гиперурикемия, подагра, уролитиаз
	Недостаточность	Х	Гиперурикемия, подагра, уролитиаз
Фосфорибозилпирофосфатсинтетаза	Гиперактивность	Х	Гиперурикемия, подагра, уролитиаз, глухота
Аденинфосфорибозилтрансфераза	Недостаточность	р	2,8-Дигидроксиаденили-тиаз
Ксантиноксидаза	Недостаточность	р	Ксантинурия и ксанти-лтиаз
Аденилосукцинат-лиаза	Недостаточность	р	Аутизм и задержка психо-моторного развития
Миоаденилатдезаминаза	Недостаточность	р	Миопатия
Аденозиндезаминаза	Недостаточность	р	Комбинированный иммунодефицит и костно-хрящевая дисплазия
Пуриннуклеозидфосфорилаза	Недостаточность	р	Т-клеточный иммунодефицит

Примечание. Х — связанное с Х-хромосомой наследование; р — аутосомно-рецессивное наследование.

Недостаточность гипоксантинфосфорибозилтрансферазы. Отсутствие активности фермента приводит к синдрому Леша–Нихена, проявляющемуся только у мальчиков повышенной экскрецией мочевой кислоты и уратов, хореоатетозом, умственной отсталостью, спастическими центральными парезами, приступами агрессивного поведения со склонностью к членовредительству. При частичной недостаточности фермента

развиваются острый подагрический артрит и нефролитиаз без неврологических проявлений.

Недостаточность аденинфосфорибозилтрансферазы (АМФ-пирофосфорилазы, трансфосфорибозидазы). Аденинфосфорибозилтрансфераза катализирует реакцию: АМФ + дифосфат = аденин + 5-фосфо- α -D-рибозо-1-дифосфат. Недостаточность фермента приводит к образованию в почках камней из 2,8-дигидроксиаденина. Клинически эта недостаточность проявляется уrolитиазом без гиперурикемии и подагры. Лабораторно определяют камни из 2,8-дигидроксиаденина коричнево-красного цвета (сероватого при высыхании) и округлые коричневатые кристаллы в моче. Для лечения эффективны диета с низким содержанием пуринов и аллопуринол. Без лечения развивается почечная недостаточность.

Недостаточность ксантиноксидазы приводит к развитию наследственной ксантинурии — наследственному нарушению обмена ксантина. В этих условиях в тканях накапливается ксантин и не образуется мочева́я кислота. Однако ксантин (основной пу́рин мочи при ксантинурии) растворяется в водных растворах не более, чем мочева́я кислота. В условиях ксантинурии формируется «ксантинная» подагра; количество больных ксантинурией довольно ограничено. Клинически характерны гидронефроз, пиелонефрит и миопатия, лабораторно — ксантинурия, низкие уровни мочево́й кислоты в сыворотке и моче, отложения кристаллов в скелетных мышцах и ксантиновые камни в мочевых путях.

Недостаточность аденилосукцинатлиазы. Характерны выраженная задержка психомоторного развития, судорожные припадки, мышечная слабость. В крови, спинномозговой жидкости повышено содержание риботидов сукциниладенозина и сукцинилами́ноимидазолкарбо́ксамида. У гомозигот развивается тяжелая форма аутизма (сукцинилпу́ринемический аутизм).

Недостаточность миоаденилатдезаминазы — наиболее частая причина метаболических миопатий (мышечная слабость и подергивания после физической нагрузки). Недостаточность может быть не только наследственной, но и приобретенной (в результате различных нервно-мышечных заболеваний, например миодистрофий или нейропатий).

Недостаточность аденозиндезаминазы приводит к развитию тяжелого комбинированного иммунодефицита.

Недостаточность пурииннуклеозидфосфорилазы. Этот фермент катализирует реакцию:

пуриновый нуклеозид + фосфат = пурин + α -D-рибозо-1-фосфат.

Недостаточность фермента ведет к развитию Т-клеточного иммунодефицита с выраженными неврологическими расстройствами. Кроме Т-клеточного иммунодефицита характерны спастическая диплегия, спастический тетрапарез, поведенческие расстройства, пирамидная симптоматика, гиперрефлексия, высокий риск развития В-иммунобластной злокачественной лимфомы. Лабораторно отмечают гипоурикемию, гипоурикозурию, экскрецию пуринов (особенно инозина и гуанозина) и лимфопению.

Методы определения

Концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови может быть определена с помощью различных методов. Концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови взрослых мужчин составляет 0,21–0,42 ммоль/л (3,6–7,7 мг%), в крови женщин уровень ее на 25% ниже. В постменопаузальном периоде половые различия в содержании мочевой кислоты в крови сглаживаются. Нет достоверных данных, свидетельствующих о повышении содержания мочевой кислоты в крови с возрастом; напротив, у новорожденных содержание мочевой кислоты более высокое, чем у взрослых. Содержание мочевой кислоты в сыворотке крови детей младше 1 года составляет 1,0–7,6 мг% (0,06–0,45 ммоль/л), 1–9 лет — 0,8–6,7 мг% (0,05–0,4 ммоль/л), 10–19 лет — 1,8–7,1 мг% (0,11–0,42 ммоль/л).

Выделение мочевой кислоты с мочой составляет 1,5–4,5 ммоль (250–750 мг)/сут; величина экскреции зависит также от присутствия пуринов в пище. При употреблении обычной пищи ежедневно в норме с мочой выделяется 0,7 г мочевой кислоты. Эта величина редко снижается ниже 0,5–0,6 г/сут даже при отсутствии в пище пуринов, однако может возрастать до 1 г/сут, если пища богата ими.

В течение длительного времени при определении мочевой кислоты в клинической биохимии доминировали химические колориметрические методы, основанные на ее окислении. При выполнении этих методов требуется предварительная депротеинизация. В качестве преципитирующих агентов использовали трихлоруксусную и фосфорновольфрамową кислоты, предложена также смесь сульфата цинка и гидроокиси бария. Ультрафильтрацию для получения безбелкового фильтрата сыворотки крови применяли в первых моделях автоматических проточных автоанализаторов.

Многие фотометрические методы основаны на окислении мочевой кислоты в аллантаин и одновременном восстановлении фосфорновольфрамовой кислоты в щелочной среде с образованием синего хромогена. Для создания щелочной среды в реакционную смесь вносят карбонат, глицин, триэтаноламин. Эта реакция неспецифична: восстановление фосфорновольфрамовой кислоты вызывают (кроме мочевой кислоты) присутствующие в сыворотке крови глутатион, фенолы, аскорбиновая кислота, глюкоза, тирозин, цистин, цистеин. Многие из этих соединений содержатся в эритроцитах, поэтому гемолиз сыворотки крови при определении мочевой кислоты нежелателен.

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УРИКАЗЫ

Несмотря на преимущества отдельных модификаций, применение химических методов было вытеснено использованием уриказы. Уриказы (оксидаза мочевой кислоты, КФ 1.7.3.3) катализирует превращение мочевой кислоты в присутствии растворенного кислорода в аллантаин с образованием перекиси водорода и углекислого газа. Активность уриказы ингибируют ионы меди и ртути, а также цианиды; фосфат и ацетат активируют фермент. Присутствие в пробе ксантина может занижать результаты определения мочевой кислоты, так как ксантин конкурентно ингибирует уриказу.

1.3. ИОНЫ

Среди всех ионов, содержание которых в биологических жидкостях (средах) определяют в клинко-диагностических лабораториях, только 4 называют электролитами. Это катионы натрия

и калий, а также анионы хлорид и бикарбонат. Именно они определяют ионную силу биологической среды — внеклеточной жидкости и ионного состава цитозоля. Все другие биологически важные ионы, например кальций, имеют либо регуляторное значение, либо составляют основу определенных тканей или структур, например кальций и фосфор в костной ткани, фосфор фосфолипидов биологических мембран, железо эритроцитов, микроэлементы как активные компоненты структуры активного центра ферментов и витаминов.

Определение электролитов и кальция — основа диагностического процесса при мониторингировании состояния вне- и внутриклеточной среды в отделениях реанимации и неотложной терапии. Определить содержание калия и натрия методически сложно. Именно это приводит к тому, что в разных лабораториях содержание в биологических жидкостях электролитов находят методами ионоселективного (непрямого) анализа, пламенной и атомно-абсорбционной спектроскопии и существенно менее совершенным методом турбидиметрии.

ЖЕЛЕЗО

В организме взрослого человека массой 70 кг содержится 3,5–4,5 г железа, основная часть которого находится в связанной с белками форме (табл. 1.4). Связывание может быть функционально активным, как это происходит в случае гемоглобина и железосодержащих ферментов (цитохромы и каталаза), или в виде неактивных транспортных форм. Железо сыворотки крови находится в связанном состоянии, так как образует комплексы с β -глобулинами и трансферрином. Небольшая оставшаяся часть катиона связана электростатическими силами взаимодействия с аминокислотами.

Обычная диета человека содержит в день 10–15 мг железа, из которых не более 10% оказывается в сыворотке крови. В результате абсорбции в двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишках ионы железа поступают в сыворотку крови, связываясь с трансферрином. Сывороточный пул железа в большей части (до 80%) использован для формирования гемоглобина эритроцитов. Увеличение синтеза гемоглобина — основное условие,

Таблица 1.4. Распределение железа в организме человека

Соединения	Концентрация, мг на 1 кг массы тела	
	мужчины	женщины
Гемоглобин	31	28
Миоглобин	4,0	3,5
Ферменты	1,5	1,0
Трансферрин	0,5	0,5
Ферритин	13	5

оказывающее выраженное влияние на метаболизм железа. Железо, включенное в гемоглобин, — своего рода буферная система, сглаживающая большие колебания в поступлении железа с пищей. В физиологических условиях эритропоэз — основной потребитель железа в организме. Оставшиеся 20% железа обычно поступают в ткани для формирования миоглобина и ферментов. Небольшая доля железа оказывается резервированной в РЭС, печени, селезенке, костном мозге. Атомы железа, освобождающиеся вследствие катаболизма гемоглобина и возникновения некротических изменений в клетках, частично экскретируются с мочой, калом, потом и желчью, частично поступают в клетки РЭС и далее опять в пул железа сыворотки крови. Экскреция железа с мочой колеблется в значительных пределах, составляя у здоровых людей 32–285 мкг/сут. Экскреция железа с калом равна в среднем 13 мг/сут и зависит от характера пищи. Таким образом, основные этапы метаболизма железа — это абсорбция, транспорт, утилизация, хранение и экскреция.

Транспорт железа в организме. Железо в плазме крови в основном связано с трансферрином, гликопротеином с молекулярной массой 76–77 кД, обладающим значительным генетическим полиморфизмом (более 20 вариантов нарушений первичной структуры). Трансферрин, как и все транспортные белки, синтезируется в печени, в небольшом количестве он также образуется в лимфоидной ткани, молочной железе, яичках и яичниках. Каждая молекула трансферрина способна связать 2 атома железа. Атом металла связывается с трансферрином только в присутствии бикарбонатов, которые, вероятно, необхо-

димы для образования комплекса железо–трансферрин. В физиологических условиях трансферрин насыщен железом примерно на 30%. Трансферрин принимает участие в обмене железа, транспортируя его между эритроидными элементами костного мозга и макрофагами. В ряде патологических ситуаций нарушается переход железа с макрофагов на трансферрин. Это может происходить при воспалении вследствие снижения содержания железа в эритроцитах и увеличения отложения его в клетках. Трансферрин также регулирует транспорт железа в гепатоциты.

Атомы железа транспортируются непосредственно в клетку путем взаимодействия комплекса железо–трансферрин со специфическими рецепторами плазматической мембраны. Комплекс железо–трансферрин проникает в цитозоль, где освобождается атом железа, а трансферрин выносится из клетки, оставаясь способным к повторному и многократному связыванию ионов железа. Ретикулоциты обладают наибольшей плотностью рецепторов к трансферрину на плазматической мембране. Железо в этих клетках связывается с протопорфирином с образованием гема, который, соединяясь с глобином, образует гемоглобин или миоглобин.

Другой белок, обладающий высокой аффинностью к железу, — лактоферрин — присутствует в биологических секретах (в бронхиальном, а также в женском молоке и цитоплазме нейтрофилов). В кислой среде сродство лактоферрина к атомам железа более высокое, чем трансферрина; в этой связи в очагах воспаления и тканевого ацидоза железо может находиться в малорастворимых комплексах и поэтому не транспортироваться в кровь. Это объясняет снижение содержания железа в сыворотке крови в условиях воспаления. К другим транспортным белкам железа относят гаптоглобин, гемопексин и альбумин.

Железо присутствует также в форме депонированного элемента в виде ферритина и гемосидерина ретикулярных клеток. Основная форма депонирования железа — ферритин, накапливающийся главным образом в печени, селезенке и костном мозге. Ферритин имеет оболочку (апоферритин) и ядро молекулы, в котором накапливается до 4500 атомов железа в форме гидроксилфосфата. Молекула гемосидерина образуется в результате частичного разрушения ферритина. Гемосидерин

присутствует в виде нерастворимого комплекса в клетках РЭС. Железо, циркулирующее в плазме крови, имеет функциональную связь с депонированным железом, которое при необходимости может быть мобилизовано и транспортировано в сыворотку крови от ретикулоэндотелиальных клеток, вовлеченных в катаболизм гемоглобина, к гепатоцитам.

Клиническое значение

Содержание железа в крови может быть как повышенным, так и сниженным.

Избыток железа в организме. Основные причины повышенного содержания железа в сыворотке крови:

- усиление разрушения эритроцитов при гемолитической и аутоиммунной анемии;
- нарушение синтеза гемоглобина (пернициозная анемия);
- острый гепатит (вирусный гепатит, токсические гепатиты);
- гемосидероз и гемохроматоз.

Недостаток железа в организме развивается постепенно, возможно, с периодами обострения, пока не возникнет выраженная анемия. Следует помнить, что снижение уровня железа в сыворотке крови не всегда соответствует дефициту железа в организме. Низкое содержание железа в крови отмечают при недостаточном поступлении его в организм у детей и вегетарианцев, вследствие нарушения депонирования железа при беременности и грудном вскармливании, в условиях нарушенного всасывания железа при тотальной и субтотальной гастрэктомии, сниженной кислотности и ахлоргидрии, хронической диарее и стеаторее. Хронические повторяющиеся потери крови при язвенной болезни, неспецифическом колите также способствуют снижению содержания в крови свободного железа. В условиях хронической инфекции возможно накопление железа в клетках РЭС.

Методы определения

Концентрация железа в крови — нестабильный параметр; отмечены колебания содержания железа в сыворотке крови даже в течение суток. Рядом исследователей продемонстрирован циркадный ритм содержания железа в крови с пиком между

8–10 ч утра и низкими значениями после полудня. Интересно, что лица, работающие в ночную смену, имеют смещение максимума содержания железа на вторую половину дня, при этом биологический ритм оказывается инвертированным. Отмечены возрастные и половые различия в уровне железа в сыворотке крови.

Определение содержания железа сыворотки крови дает представление об уровне транспортируемого железа в плазме крови, связанного с трансферрином. Большие вариации содержания железа в сыворотке крови, возможность его увеличения в условиях некротических процессов в тканях (острый гепатолизис), его снижение при воспалительных процессах ограничивают диагностическое значение измерения железа сыворотки крови. Очевидно, что, измеряя только содержание железа в сыворотке крови, получить желаемую информацию о причинах его нарушенного обмена невозможно. Результаты этого исследования служат основанием для выполнения более сложных методов — определения содержания в крови трансферрина и ферритина.

Трансферрин. В сопоставлении с содержанием железа в сыворотке крови уровень трансферрина и насыщение его железом — более стабильные величины с менее выраженными различиями по полу и возрасту. Основные причины сниженного содержания трансферрина в сыворотке крови: торможение синтетических процессов в гепатоцитах (хронический гепатит, цирроз, хроническая нефропатия, голодание, неопластические процессы), а также значительная потеря белка при нефротическом синдроме или заболеваниях тонкой кишки. Концентрация трансферрина в крови может быть повышенной при железодефицитной анемии, беременности в последнем триместре, у женщин при приеме пероральных контрацептивов.

Ферритин. Определение ферритина в клинической практике позволяет улучшить диагностику нарушений метаболизма железа. Это наиболее чувствительный тест с целью выявления дефицита или избытка железа. Однако определение ферритина может давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты при воспалениях, опухолях, патологии печени, когда содержание ферритина может быть увеличено, отражая дефицит депонированного железа. В ряде случаев у пациентов, находящихся на

программном гемодиализе, отмечают парадоксально повышенный уровень ферритина при аккумуляции железа в клетках РЭС, при этом в костном мозге может быть одновременно дефицит железа. Следовательно, при оценке обмена железа следует проводить комплексные исследования.

Нарушения метаболизма железа следует дифференцировать от снижения содержания железа в сыворотке крови, сопровождающего воспалительные процессы. Это требует точных и воспроизводимых методов исследования.

Доминирующий метод определения железа сыворотки крови — спектрометрия. Колориметрическое определение железа сыворотки крови предполагает проведение нескольких этапов: диссоциацию железа из комплекса с трансферрином, восстановление иона железа из Fe^{3+} в Fe^{2+} , формирование комплекса железо-хелатированный хромоген.

Часть белков в кислой среде мешает определению окрашенного комплекса, что требует депротеинизации. Международным комитетом по стандартизации в гематологии предложено преципитировать белки трихлоруксусной кислотой. Однако вследствие широкого применения автоматизированных систем методы, включающие депротеинизацию, большого распространения не получили. В прямых методах стабилизация белков достигается добавлением детергентов.

Диссоциацию комплекса железо-трансферрин осуществляют снижением pH. Для диссоциации комплекса предпочтительно значение pH 5,0, при этом одновременное добавление восстановителя позволяет провести диссоциацию полностью. В качестве восстановителей используют сульфит, дитионит, гидразин, гидроксилламин, гидроквитон, меркаптоацетат. Наиболее распространено применение тиогликолевой и особенно аскорбиновой кислот.

Некоторые комплексообразователи, связывающие электростатически двухвалентные катионы (хелаторы), могут после комплексования с ионами железа изменять цвет комплекса. Для удовлетворения требованиям клинической биохимии комплексон должен обладать определенной специфичностью именно к атомам двухвалентного железа, иметь достаточно высокий коэффициент молярного поглощения, обладать максимумом поглощения

в удобной для фотометрии области длин волн. Кроме того, комплексон должен быть хорошо растворим и устойчив в водной среде, образовывать стабильные комплексы.

В течение длительного времени в клинической биохимии для определения железа применяли батофенантролин, хотя для растворения его требовалась хлорсульфоновая кислота, опасная при использовании в лаборатории. В настоящее время наиболее чувствительный хромоген — ферен-S. Хромогены с высокой чувствительностью (феррозин и ферен-S) не обладают достаточной специфичностью: они способны образовывать окрашенные комплексы и с медью. В случаях повышенного содержания меди превышение определения железа достигает 10%. Интерферирующее влияние меди может быть устранено добавлением соответствующих реагентов. Применение неocupроина, тиосемикарбазида и тиомочевины, которые образуют устойчивые комплексы с медью, исключает ее взаимодействие с хромогеном.

Прямое определение железа в реакции с ференом-S в качестве хромогена при отсутствии интерференции ионов меди рассматривают как метод выбора, обладающий достаточной чувствительностью и специфичностью, не требующий специальной аппаратуры. В умеренно кислой среде (рН 4,8, ацетатный буфер) даже при наличии в сыворотке крови гемоглобина диссоциации железа из комплекса гемоглобина не происходит, что исключает возможность получения ложнозавышенных результатов. Метод на 60% более чувствителен по отношению к реакции с батофенантролином. Использование ферена-S позволяет проводить исследование с высокой точностью, достаточной специфичностью, требует малого количества образца, что особенно важно в педиатрии.

В ходе метода происходит диссоциация железа сыворотки крови и трансферрина в кислой среде, затем ионы железа восстанавливают до Fe^{2+} аскорбиновой кислотой, после чего при взаимодействии с комплексом ференом-S образуется комплекс синего цвета. Для предупреждения образования комплекса ферена-S с атомами меди их предварительно связывают тиомочевинной. Добавление детергента к реакционной смеси позволяет избежать депротеинизации. Окраска развивается в течение 5 мин при комнатной температуре. Образованный комплекс

оказывается стабильным по меньшей мере в течение 90 мин. Метод обладает хорошей линейностью: он позволяет без разведения образца определить концентрацию железа в пробе свыше 1000 мкг/дл. Исследование может быть проведено при использовании как сыворотки, так и плазмы крови. Если в пробе высокая концентрация липидов или билирубина, требуется постановка контрольной пробы или двухволновое фотометрирование пробы. Метод не только прост в ручном исполнении, но и служит лучшей основой для применения на многоканальных биохимических анализаторах.

Измерение содержания железа сыворотки крови с целью диагностики истинной железodefицитной анемии дополняют исследованием трансферрина и степени его насыщения железом. Наиболее достоверный тест оценки железodefицитной анемии — определение в крови содержания трансферрина. Содержание трансферрина в крови можно измерить как иммунохимическими методами, включая радиальную иммунодиффузию, турбидиметрию и нефелометрию, так и функциональными методами, основанными на связывании ионов железа. Широко используют определение насыщения трансферрина (как транспортного белка) ионами железа в растворе с избытком ионов железа. Избыток не связанных с белком ионов железа удаляют из раствора при обработке последнего основным карбонатом магния или взаимодействием с ионообменными смолами, после чего определяют содержание сывороточного железа. Методы, основанные на абсорбции железа, просты и дают воспроизводимые результаты, если тщательно удалять избыток добавленных ионов железа.

Ферритин — один из наиболее важных лабораторных параметров при заболеваниях, вызванных недостатком или избытком железа. Разработаны иммунохимические методы определения ферритина в плазме крови. В настоящее время отработан международный стандарт ферритина, что позволяет стандартизировать выполняемые исследования.

Таким образом, современное исследование метаболизма железа включает определение железа, трансферрина и ферритина сыворотки крови. Нормальные значения основных параметров, характеризующих обмен железа, представлены в табл. 1.5.

Таблица 1.5. Нормальные значения основных параметров обмена железа в организме человека

Параметр	Мужчины	Женщины
Железо сыворотки крови:		
мкг/дл	50–160	40–150
мкмоль/л	9–29	7–27
Трансферрин, мг/дл	200–320	200–320
Ферритин, нг/мл	15–200	15–200
Общая железосвязывающая способность сыворотки крови:		
мкг/дл	250–400	250–400
мкмоль/л	45–72	45–72
Насыщение трансферрина, %	20–55	20–55

КАЛЬЦИЙ

При нормальных условиях в организме более 90% кальция фиксируется костной тканью. Из оставшегося количества 40% циркулирует в комплексе с белками, а 9% — в виде солей (фосфаты, цитрат). Таким образом, только 51% от общего содержания присутствуют в ионизированной форме (Ca^{2+}) и способны диффундировать в межклеточную жидкость.

Внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} на несколько порядков ниже содержания таких катионов, как калий, натрий и магний. Большая часть кальция в клетке связана с растворимыми лигандами, клеточными мембранами или аккумулирована во внутриклеточных депо. Именно свободный кальций (Ca^{2+}) служит регулятором внутриклеточных процессов. В клетке концентрация Ca^{2+} очень мала (0,1 мкмоль/л воды). С наружной стороны плазматической мембраны содержание Ca^{2+} достигает 1,5–2,5 ммоль/л, т.е. оно в 2000 раз выше, чем с внутренней. Плазматическая мембрана клеток обладает низкой проницаемостью для Ca^{2+} ; выведение Ca^{2+} из клетки — энергозависимый процесс. Благодаря низкому содержанию Ca^{2+} в цитоплазме клеток и высокому градиенту концентрации по обе стороны плазматической мембраны этот ион имеет важное значение

в регуляции жизнедеятельности клеток. Общепринято, что Ca^{2+} участвует в передаче сигнала из внешней среды. Физиологически действие кальция связано с регуляцией проницаемости клеточных мембран: при низкой концентрации Ca^{2+} в экстрацеллюлярной жидкости проницаемость мембран клеток увеличивается, приводя к повышению возбудимости клеток в центральной и периферической нервной системе. В противоположность этому при высокой концентрации Ca^{2+} проницаемость клеточных мембран уменьшается со снижением рефлекторной активности, изменениями ЭКГ и возникновением болей в животе, миопатий и потерей аппетита. Изменение проводимости кальциевых каналов мембраны и внутриклеточного содержания Ca^{2+} изменяет функционирование многих систем, включая процессы клеточного деления.

Клиническое значение

Содержание кальция в сыворотке крови изменяется при дисфункции паращитовидных и щитовидной желез, новообразованиях различной локализации (особенно при метастазировании в кости) и почечной недостаточности. Вторичное вовлечение кальция в патологический процесс происходит при почечной недостаточности, патологии ЖКТ. Нередко гипо- и гиперкальциемия может быть первым проявлением патологического процесса. Терапевтические процедуры (гемотрансфузия, экстракорпоральные методы лечения) способны изменить обмен кальция и концентрацию катиона в сыворотке крови.

Частота гиперкальциемии при язвенной болезни более высокая, чем при других видах патологии. Наличие клинической картины панкреатита также может быть связано с нарушением метаболизма кальция. В первую неделю острого панкреатита возможно развитие гипокальциемии, которая позже может смениться гиперкальциемией. Гиперкальциемия может быть следствием интоксикации витамином D. Опасную для жизни гиперкальциемию отмечают при уровне кальция в сыворотке крови выше 15 мг% (3,75 ммоль/л). Клинические симптомы выраженной гиперкальциемии: стойкий запор, рвота, полиурия, сонливость и кома.

В популяции значительная гиперкальциемия отмечена у 0,6% обследованных; гиперпаратиреоз установлен у 86% этих пациентов. В клинической практике гиперкальциемия отмечена у 5% больных; наиболее частой причиной был злокачественный процесс, менее часто выявлен первичный гиперпаратиреоз. Причинами гиперкальциемии могут быть также вторичный гиперпаратиреоз и другие эндокринные нарушения (тиреотоксикоз, надпочечниковая недостаточность, акромегалия, секреция ПТГ клетками опухолей разных органов).

Показания для исследования концентрации кальция в сыворотке крови в клинике общего профиля: почечнокаменная болезнь, патология костной ткани, артериальная гипертензия, подагра, миопатия, пептические язвы желудка, панкреатит, выраженное снижение массы тела, психические нарушения. Исследования уровня кальция проводят у пациентов с острой и хронической почечной недостаточностью, при гемодиализе и экстракорпоральных методах лечения. Мониторирование содержания кальция в крови проводят в ходе больших оперативных вмешательств. Исследование кальция сыворотки крови показано также при почечной колике, гематурии и пиелонефрите.

От 30 до 70% случаев первичного гиперпаратиреоза сопровождаются повышенным АД. В этих случаях лечение тиазидными диуретиками может маскировать гиперкальциемию. Артериальная гипертензия при гиперкальциемии может быть связана с патологией почек.

Основная причина гиперкальциемии в пожилом возрасте — новообразование с метастазами в кости. В большинстве случаев при гиперкальциемии обнаруживается нормальное содержание в сыворотке крови фосфора и хлоридов. Наиболее часто метастазы в кости выявляются при раке легких, молочной железы, почек и печени. Заболевания системы крови (множественная миелома, лимфома, острый лейкоз) часто сопровождаются гиперкальциемией. Стероидиндуцированную гиперкальциемию можно наблюдать при приеме андрогенов, эстрогенов и глюкокортикоидов. Саркоидоз, туберкулез, гистоплазмоз также сопровождаются гиперкальциемией. Гиперкальциемию отмечают в педиатрической практике, особенно в условиях недостаточного поступления

с пищей витамина D. В этих ситуациях витаминотерапия способствует нормализации содержания в крови как кальция, так и фосфора.

Методы определения

В норме содержание кальция в сыворотке крови здорового человека составляет 2,2–2,6 ммоль/л. При определении концентрации кальция необходимо учитывать состояние пациента в момент взятия крови. Гиперкальциемия как артефакт может возникать при взятии крови в условиях выраженного венозного стаза. Содержание Ca^{2+} у человека в горизонтальном и вертикальном положении после небольшой физической активности отличается на 0,32 ммоль/л, поэтому кровь на определение кальция следует брать в условиях минимального венозного стаза. Содержание кальция в крови зависит также и от приема пищи: после еды оно возрастает на 0,1 ммоль/л. Поскольку почти половина количества кальция сыворотки крови связана с альбумином, следует учитывать также вариации в содержании белка.

После взятия крови имеется несколько источников ошибок. Абсорбция Ca^{2+} на стенках пластикового шприца, взаимодействие с CO_2 воздуха, изменение температуры меняют соотношение свободного и ионизированного кальция. Использование в отдельных видах вакутейнеров полистироловых шариков, геля акриламида также способствует абсорбции кальция, в результате чего получаются заниженные результаты. В моче при стоянии соли кальция преципитируют, особенно фосфат кальция, что снижает результаты определения экскреции кальция. Мочу для определения кальция следует собирать в контейнеры, содержащие HCl при хорошем перемешивании.

Определение содержания кальция в сыворотке крови дает представление о суммарной концентрации его ионизированной и неионизированной форм. Общепринято, что определение ионов Ca^{2+} дает более ценную диагностическую информацию, чем определение общего уровня кальция. Определение Ca^{2+} наиболее обосновано в условиях высокой концентрации в крови низкомолекулярных лигандов, при острых клинических ситуациях,

сопровождающихся нарушением электролитного баланса и КЩР. Определение Ca^{2+} должно быть компонентом оценки состояния КЩР, газов и электролитов крови в любых экстренных ситуациях. Для подобного комплекса имеются и методические обоснования: определение содержания Ca^{2+} в крови проводят в анаэробных условиях с последующей коррекцией в зависимости от рН. Наиболее современный метод определения ионизированного кальция — использование ионоселективных электродов.

Старейший метод определения общего кальция включает количественную преципитацию кальция избытком анионов щавелевой, хлоранилиновой или нафтилгидроксаминовой кислоты. В случае оксалата преципитат определяют титрованием с перманганатом калия и сульфатами. Самый распространенный оксалатный метод служил в течение многих лет референсным методом для определения кальция.

Методы с использованием ионов хлоранилата и нафтилгидроксамата для преципитации кальция основаны на колориметрическом определении преципитирующего иона. Избыток хлоранилата вносят для реакции с ионами кальция. Образованный комплекс преципитируется и растворяется в щелочном растворе ЭДТА.

Предложен чувствительный флуоресцентный метод для микроанализа в сыворотке крови и моче — взаимодействие кальция с кальцеином, флуоресцирующим при 520 нм и высоком значении рН. Флуоресцирующий комплекс титруют этиленгликольтетрауксусной кислотой, связывающей кальций, что приводит к снижению флуоресценции. Магний и фосфор не влияют на этот метод.

Прямое спектрофотометрическое определение концентрации кальция в сыворотке и моче основано на формировании окрашенных комплексов кальция и органических молекул. Наиболее распространенный реагент — о-крезолфталейн. В ходе реакции образуется красный комплекс (570 или 575 нм) при рН 10,0–12,0. Продукт реакции можно стабилизировать цианидом калия, способствующим устранению влияния тяжелых металлов. Для устранения влияния магния следует добавить 8-гидроксихинолин. Для уменьшения влияния белков пробы мо-

гут быть диализованы или значительно (в 40–100 раз) разведены кислым раствором для освобождения связанного кальция. Метод с о-крезолфталейном адаптирован для многих автоанализаторов, что дает высокую воспроизводимость. Проблема использования этого метода состоит в поддержании постоянной температуры во время проведения анализов, поскольку молярная абсорбция хромогена зависит от температуры.

Наиболее часто используемый референсный метод точного определения кальция — атомная абсорбция. Метод не подвержен влиянию гемоглобина, билирубина и липемии, на него оказывают влияние только хелаторы. По сравнению с атомной абсорбцией результаты метода с о-крезолфталейном дают небольшое завышение (10–15 мг/л). Дополнительный метод для определения кальция — изотопно-разведенная масс-спектрометрия. Метод обладает высокой точностью, но применение его ограничено.

МАГНИЙ

Общее содержание магния в организме человека составляет около 25 г, при этом примерно 60% его содержится в костной ткани. Сбалансированная диета содержит 300–350 мг магния в сутки. Главные источники магния — орехи, овес, зелень, мясо. Большая часть магния абсорбируется в тонкой кишке. Витамин D и его метаболиты повышают абсорбцию магния, но в меньшей степени, чем кальция. Избыток в пище органических кислот связывает магний, нарушая его всасывание. Магний содержится во всех тканях организма, но наибольшее его содержание на единицу массы тела отмечено в миокарде. 1/3 всего магния не участвует в обменных процессах. Около 75% магния в сыворотке крови присутствует в ионизированной форме, 22% связано с альбумином и 3% — с глобулинами. Физиологически магний выступает как антагонист кальция; его дефицит сопровождается накоплением кальция в сыворотке крови.

Большая часть магния содержится внутри клетки. Чем выше метаболическая активность клетки, тем выше содержание в ней магния. В клетке основная часть магния связана с белками, он присутствует в ядре, митохондриях, эндоплазматиче-

ском ретикулуме, цитоплазме. В цитоплазме около 80% магния находится в комплексе с АТФ. Концентрация ионизированного магния в клетке поддерживается на постоянном уровне даже при резких колебаниях внеклеточного содержания катиона. Этому способствуют относительно ограниченная проницаемость плазматической мембраны для катиона и наличие системы транспорта магния в клетку для поддержания высокого трансмембранного градиента. Скорость обмена магния в миокарде, гепатоцитах, ткани почек более высокая по сравнению со скелетной мускулатурой, тканью мозга, эритроцитами. Поступление магния в клетку ингибируют β -адреноблокаторы, PG E, усиливает форболовый эфир. Инсулин способствует выходу внутриклеточного магния во внеклеточную среду, адреналин и глюкокортикоиды, наоборот, повышают содержание магния в клетке.

Магний — облигатный кофактор многих ферментативных реакций. Он формирует субстрат для многих ферментов в виде комплекса магний-АТФ. Магний выступает в роли физиологического регулятора клеточного роста, поддерживая адекватный запас пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, необходимых для синтеза ДНК и РНК. При истощении внутриклеточного содержания магния снижается синтез белка: магний необходим на всех этапах синтеза белковой молекулы.

Почки — основной регулятор поддержания постоянной концентрации магния в организме. При истощении запасов магния его экскреция снижается или прекращается вообще. При усиленном поступлении магния с пищей или водой, при парентеральном введении почки быстро экскретируют избыток катиона. Магний проходит через фильтрационный барьер почечных телец, после чего 80% катиона реабсорбируется в проксимальных канальцах восходящего сегмента петли Генле. Реабсорбция зависит от содержания в моче солей и скорости прохождения жидкости через почечные каналы. Транспорт магния в канальцах зависит от трансэпителиального потенциала, возникающего при реабсорбции натрия. Гипермагниемия сопровождается снижением реабсорбции магния. Большие дозы ПТГ способствуют снижению экскреции магния с мочой. Глюкагон и кальцитонин оказывают такое же действие.

Клиническое значение

Активное участие магния в физиологических процессах — основа многообразия клинической симптоматики при гипо- и гипермагниемии.

ГИПОМАГНЕЗИЕМИЯ

В клинической практике дефицит магния распространен чаще, чем его выявляют при исследовании содержания катиона в сыворотке крови. В больших многопрофильных клинических отделениях гипомagneзиемию отмечают у каждого 10-го пациента. Гипомagneзиемия развивается вследствие потери магния через ЖКТ или с мочой. Потери магния велики при острой и хронической диспепсии, энтеритах, язвенном колите, наличии кишечной фистулы. 20% выраженных гипомagneзиемий выявляются при острой непроходимости кишечника и отечном панкреатите. Снижено содержание магния в крови при алкоголизме и сахарном диабете. Причина гипомagneзиемии у новорожденных — нарушение всасывания магния.

В ряде клинических ситуаций потери магния с мочой также приводят к истощению катиона. Дефицит магния отмечают при первичном гипоальдостеронизме. Гиперкальциемия, сопровождающаяся понижением реабсорбции магния в канальцах, также способствует гипомagneзиемии. Диуретик фуросемид, действуя на проксимальные отделы нефрона, повышает экскрецию магния. Фармакологические препараты, действующие на уровне дистальных отделов нефрона (амилорид, спиронолактон), также способствуют экскреции магния с мочой. Аминогликозиды повышают экскрецию магния и вызывают гипомagneзиемию; циклоsporин, обладая нефротоксичностью, усиливает выведение магния с мочой. При хроническом ацидозе, как и при хроническом алкоголизме, потеря магния с мочой возрастает. Любые патологические процессы в канальцах почек усиливают экскрецию магния с мочой.

Около 30% больных сахарным диабетом имеют разную степень гипомagneзиемии. При гипомagneзиемии у пациентов с сахарным диабетом гипергликемия натошак более значительна и течение диабета, как правило, более тяжелое. Отношение маг-

ний/креатинин в моче увеличивается пропорционально тяжести клинического течения сахарного диабета. Такое состояние можно наблюдать и при тяжелом клиническом течении гиперпаратиреоза и тиреотоксикоза.

Среди клинических симптомов гипомagneзиемии доминируют нейромышечные расстройства. Поскольку дефицит магния часто оказывается вторичным, клинические симптомы не всегда ярко выражены. Гипомagneзиемия даже без гипокалиемии приводит к мышечной гиперактивности (атаксия, тремор, рвота), повышает мышечную возбудимость, вызывает гиперрефлексию. Важный аспект дефицита магния — аритмия; применение сульфата магния приводит к нормализации ритма сердца. Интоксикация сердечными гликозидами тоже сопровождается гипомagneзиемией. Гипомagneзиемия активирует секрецию ПТГ. Неэффективность лечения гипокальциемии витамином D в ряде случаев обусловлена именно гипомagneзиемией; инъекции сульфата магния купируют гипокальциемию. Следует заметить, что выраженная гипомagneзиемия часто сопровождается гипокалиемией. При дефиците магния калий покидает клетку, что приводит к снижению его концентрации в цитоплазме. Введение в таких случаях больших доз калия без добавления магния недостаточно эффективно. При истощении запасов магния и гипомagneзиемии содержание натрия и кальция в клетках повышается, а уровень калия падает.

Магний — один из активных регуляторов сосудистого тонуса. Спазм сосудов, стенокардия, аритмия, тромбозы развиваются чаще на фоне гипомagneзиемии. Магний влияет на тонус сосудистой стенки, способствуя ее дилатации. Эпидемиологические исследования выявили повышение частоты гипертонической болезни в биогеохимических провинциях, в которых в воде понижено содержание магния и кальция. С другой стороны, у пациентов с эссенциальной гипертонией снижено содержание магния в эритроцитах. Низкая концентрация внеклеточного магния приводит к спазму сосудов, повышая их чувствительность к прессорным агентам. В условиях гипомagneзиемии назначение сульфата магния способствует снижению АД и повышает чувствительность к гипотензивным препаратам.

Эпидемиологические исследования выявили также более частое развитие инфаркта миокарда у лиц, живущих в местности

с мягкой водой. При этом содержание магния в ткани миокарда оказывается сниженным. Низкое содержание магния отмечено и в сердечной мышце пациентов, погибших от инфаркта миокарда. Клинические исследования показали, что при инфаркте миокарда в условиях быстрого обмена магния между сывороткой крови и миоцитами наиболее выраженное падение содержания катиона в сыворотке крови наступает через 24–48 ч после приступа стенокардии.

В условиях стресса, при повышении в крови концентрации катехоламинов и стероидов, содержание магния как в клетке, так и в сыворотке крови понижается. У пациентов с ИБС содержание магния в сыворотке крови также понижено; резкое падение концентрации магния в крови может быть одной из причин внезапной смерти. Терапия магнием при инфаркте миокарда сопровождается ограничением зоны поражения, снижением частоты сердечных аритмий и уменьшением смертности.

Недостаток магния влияет на жирнокислотный состав липидов, снижает активность ферментов системы элонгации и десатурации жирных кислот, блокируя синтез арахидоновой кислоты. Изменение жирнокислотного состава липидов сопровождается уменьшением жидкой консистенции биологических мембран и изменяет активность мембранно-связанных ферментов. Повышение агрегации тромбоцитов в условиях гипомagneзмии увеличивает опасность тромбоэмболических осложнений. В условиях атерогенной диеты недостаток в пище магния способствует прогрессированию склеротического поражения сосудов; введение магния приводит к регрессии гиперхолестеринемии.

По мнению ряда исследователей, магний играет роль природного гиполипидемического агента. Длительное состояние гипомagneзмии действительно способствует активации атеросклеротического процесса, поддержанию ГЛП, имеющей ретенционное происхождение. В условиях гипомagneзмии снижена активность основных ферментов метаболизма ЛП: гепаринзависимой липопротеинлипазы и лецитинхолестеринацилтрансферазы. ГЛП при гипомagneзмии способствует также прогрессированию жировой инфильтрации печени.

Гипомagneзмию наиболее часто отмечают у пациентов, страдающих алкоголизмом. Этим в определенной степени мож-

но объяснить клиническую симптоматику, свойственную этому заболеванию. Возможно, это связано с токсическим влиянием метаболитов алкоголя на процессы энергообразования. Гипомагниемия часто развивается при терапии антибиотиками, производными аминогликозидов. В процессе деструкции их в лизосомах образуются токсичные аminosоединения, которые в митохондриях нарушают формирование макроэргических соединений. Применение диуретиков также способствует гипомагниемии. Гипокалиемия, возникающая при многих патологических состояниях, может быть купирована более успешно, если одновременно с калием вводить соли магния. Введение солей магния способно повышать внутриклеточное содержание калия.

ГИПЕРМАГНЕЗИЕМИЯ

Слабое или умеренное повышение содержания магния в сыворотке крови отмечено у 8–12% больных, госпитализированных в многопрофильные учреждения. В небольшом проценте случаев гипермагниемия может быть следствием усиленного поступления магния с пищей. Чаще всего гипермагниемия возникает в результате применения солей магния с лечебной целью. Выраженная гипермагниемия сопровождается почечную недостаточность. Лечение маниакального синдрома карбонатом лития приводит к выраженной гипермагниемии. Гипермагниемия отмечена также при гипотиреозе, лактат-ацидозе, гепатите, злокачественных новообразованиях. Клинические симптомы гипермагниемии проявляются при содержании магния в сыворотке крови выше 5 мг% (норма 1,7–2,2 мг%). Сонливое состояние наступает при содержании магния в сыворотке крови, превышающем 4 мг%. Паралич мускулатуры и остановка дыхания возникают при гипермагниемии порядка 10–12 мг%.

Гипермагниемии у взрослых чаще наблюдают в амбулаторных условиях; в стационаре она преобладает в гинекологическом, хирургическом и психиатрическом отделениях.

Методы определения

Как было сказано выше, основное содержание Mg^{2+} выявляется внутри клеток. Несмотря на это, его содержание наиболее часто исследуют в сыворотке крови, что проще и доступней.

При оценке результатов определения магния следует принимать во внимание состояние пациента: стресс, наличие острых инфекций.

В норме содержание магния в сыворотке крови составляет 0,65–1,05 ммоль/л; оно несколько выше у детей, чем у взрослых, и не отличается у мужчин и женщин. Экскреция магния с мочой у здорового человека составляет примерно 100 мг в сутки.

Способы определения магния в биологических жидкостях включают: преципитацию; комплексометрию и спектрофотометрию; плазменно-абсорбционную спектроскопию; электро-термальную абсорбционную спектроскопию; ионоселективную потенциометрию; плазменно-эмиссионную спектрофотометрию; ферментативные методы.

Первым методом определения магния была преципитация в форме MgNH_4PO_4 : количество преципитата измеряли гравиметрически или по содержанию фосфата. Позже было предложено преципитировать магний гидроксидом; сейчас эти методы представляют только исторический интерес. При пламенной спектрофотометрии возможно измерить эмиссию магния при длине волны 285, 370 или 383 нм. Позже были предложены методы комплексометрии при использовании ЭДТА. Одновременно для определения содержания магния в биологической жидкости использовали красители эриохром, титановый желтый, магон, кальмагит. Последний в разных модификациях применяют при работе на биохимических анализаторах. Возможно использовать и флуорометрический способ определения магния при образовании комплексов с кальцеином, дигидробензолом и 8-гидроксидом. При использовании последнего соединения образуется хелатный комплекс с максимумом возбуждения при длине волны 420 нм и испускания 530 нм. Применение этиленгуанинтетраацетата натрия позволяет увеличить специфичность определения. В настоящее время используют кальмагит — металлохромный краситель, применение которого не требует депротеинизации сыворотки крови. В ходе реакции при формировании комплекса Mg –кальмагит щелочной реактив голубого цвета превращается в фиолетовый. Этиленгуанинтетраацетат натрия предотвращает реакцию с кальцием, а цианистый калий ингибирует образование комплексов с тяжелыми металлами. Наличие в среде по-

ливинилпирролидона предотвращает связывание комплекса Mg -кальмагит с белками сыворотки крови.

В спектрофотометрическом методе, основанном на реакции магния с титановым желтым, реакция протекает в щелочной среде с формированием гидроокиси магния. Коллоидные частицы гидроокиси абсорбируют титановый желтый с формированием комплекса красного цвета (максимум абсорбции при длине волны 540 нм). Для предотвращения преципитации коллоидных частиц в среду добавляли поливиниловый спирт. В настоящее время в качестве референсного метода определения магния используют атомно-абсорбционную спектроскопию. Атомы магния обладают выраженной абсорбцией в области 285,2 нм, которую и используют для измерения его концентрации. Для определения магния отработаны и методы «сухой химии» — диагностические полоски. Последний из предложенных методов определения содержания магния в биологических жидкостях — ферментативный метод. Его основа — определение глюкозы при действии гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В реакции при избытке субстрата образование НАДФН пропорционально наличию комплекса Mg -АТФ. Исследование катиона в сыворотке крови и моче таким способом хорошо согласуется с данными атомно-абсорбционного анализа.

Ионизированный Mg^{2+} измеряют потенциометрически. Ионоселективный электрод снабжен жидкостной мембраной с нейтральным компонентом, ответственным за ее селективность. Ионный радиус Mg^{2+} составляет 72 пм, в то время как Ca^{2+} — 100 пм. Растворимость соединений кальция более низкая, чем магния. Линейность процедуры составляет от 0,2 до 3 мМ. Потенциометрию проводят в буферном растворе, содержащем ионы Mg^{2+} в той же концентрации, что и в сыворотке крови; коэффициент вариации при определении магния в сыворотке крови не превышает 2,8% в серии и 3,9% — изо дня в день. Метод не вполне специфичен: электроды регистрируют также ионы Ca^{2+} и ионы Na^+ . Водородные ионы не оказывают влияния в пределах рН 5,6–7,8. Концентрация ионизированного Mg^{2+} в сыворотке крови составляет 0,54–0,55 ммоль/л. Определение Mg^{2+} при применении ионоселективного электрода достоверно коррелирует с анализом содержания магния в ультрафильтрате. Приведенные

методы, однако, не позволяют определить содержание магния в клетке.

Измерение внутриклеточного содержания магния способно дать дополнительную диагностическую информацию. Описаны методы флюорометрического определения содержания магния в лимфоцитах и моноцитах крови. Разработана также техника измерения содержания внутриклеточного магния в эксперименте при использовании селективных электродов.

Нагрузочный тест. Содержание магния в сыворотке крови в ряде клинических ситуаций не отражает его внутриклеточный дефицит. Уточнить ситуацию помогает нагрузочный тест, при выполнении которого в течение 8–12 ч пациенту внутривенно вводят 30 ммоль сернокислого магния в 0,5 л 5% раствора декстрозы, одновременно собирая суточную мочу. Если за это время с мочой экскретируется менее 50% введенного магния, диагностируют скрытый недостаток магния в организме.

НАТРИЙ

Для более детального понимания изменений содержания натрия в сыворотке крови необходимо вспомнить, что в организме есть два водных пространства: внутриклеточное и внеклеточное. Внеклеточное в свою очередь делят на внутрисосудистое (сыворотка, плазма крови) и внесосудистое (межклеточная жидкость). Общее количество воды в организме составляет 60% массы тела, при этом 2/3 приходится на внутриклеточную жидкость, 1/3 — на внеклеточную жидкость. 75% внеклеточной жидкости составляет интерстициальная жидкость, 25% внеклеточной жидкости — плазма крови.

Сопоставление химического состава вне- и внутриклеточной жидкости выявляет существенные различия. Na^+ — основной одновалентный катион внеклеточной жидкости, основной внутриклеточный катион — K^+ . Нарушение взаимоотношения вне- и внутриклеточных катионов — патогенетическое звено многих патологических процессов.

Изменение соотношения Na^+ во внеклеточном и внутриклеточном пространстве определяет соотношение объемов внутри- и внеклеточной жидкости, изменение осмотического давления,

развитие отеков и обезвоживания. Повышенное или пониженное содержание Na^+ во внутрисосудистом пространстве определяет соотношение потоков жидкости, то есть или переполнение сосудистого русла (артериальная гипертензия), или выход воды в межклеточное пространство (отеки).

Кроме поддержания постоянства внеклеточной среды натрий обладает и рядом регуляторных влияний. Так, транспорт глюкозы в клетку зависит от присутствия натрия во внутриклеточной среде: увеличение внутриклеточной концентрации натрия усиливает вход глюкозы в клетку. Транспорт аминокислот и моносахаров в клетки — также Na -зависимый процесс. Развитие гипогликемии у пациентов с недостаточностью надпочечников (болезнь Аддисона) связывают с нарушением всасывания глюкозы энтероцитами в условиях гипонатриемии, когда снижено фосфорилирование глюкозы.

Na^+ — ион, концентрация которого в крови поддерживается в наиболее узком пределе. Для Na^+ колебания значений нормы (135–145 ммоль/л) составляют только 7% его содержания. Поддержание концентрации натрия в плазме крови в узких пределах — результат сочетанного действия многих регуляторных факторов: гипоталамуса, гипофиза, надпочечников и почек, стенки предсердий. Накопление натрия в плазме крови может быть следствием как пониженного содержания в тканях воды, так и избытка натрия. Содержание воды в тканях изменяется более часто по сравнению с истинным накоплением или падением концентрации натрия. Патологические аспекты нарушения распределения натрия и воды между водными пространствами имеют большое значение в формировании клинической картины; порой эти состояния трудно удается дифференцировать. Для понимания патофизиологии гомеостаза натрия следует рассмотреть взаимоотношение между уровнем натрия в сыворотке крови и степенью гидратации (содержанием в организме воды).

Сыворотка крови на 93% состоит из воды и только на 7% — из неводных компонентов, главным образом липидов и белков. Натрий распределен только в водной фракции. При гиперпротеинемии или гипергликемии масса неводных компонентов увеличивается, а жидких уменьшается. При нормальном содержании натрия в жидкой части сыворотки крови и расчете его на весь

объем биологической пробы возможно получение ложнозаниженных результатов. Чем больше в биологической пробе белков, ЛП или глюкозы, тем с большей вероятностью ошибки будет диагностирована ложная гипонатриемия, особенно при непрямом ионоселективном анализе. При сахарном диабете гиперлипидемия наблюдается у 20–70% больных, у половины из них обычно отмечают кетоацидоз; именно в таких клинических ситуациях у 40% больных выявлена псевдогипонатриемия.

Клиническое значение

Содержание натрия различается в отдельных пулах внеклеточной жидкости. Так, если в плазме крови содержание натрия составляет 135–145 ммоль/л, то в отечной жидкости — 135 ммоль/л, синовиальной — 142 ммоль/л, спинномозговой жидкости — 146 ммоль/л. В слезной жидкости содержание натрия такое же, как и в плазме крови. Содержание натрия в плазме крови, определенное прямым методом ионоселективного анализа, составляет 135–145 ммоль/л. Уровень натрия в моче при разном пищевом режиме равен 40–220 ммоль/сут.

ГИПЕРНАТРИЕМИЯ

В клинически сложных ситуациях гипернатриемии встречаются нечасто. Она характерна для состояния сильного потоотделения, несахарного мочеизнурения при патологических процессах в гипоталамической области мозга, болезни и синдрома Кушинга. При заболеваниях почек патофизиологические процессы меняют обмен натрия. Когда протеинурия возникает в результате первичного поражения фильтрационного барьера почечных телец и скорость клубочковой фильтрации не изменена, развивается гипопроteinемия. При этом задержка натрия в почках — следствие снижения объема крови. Если снижение скорости клубочковой фильтрации первично, задержка воды и соли ведет к увеличению объема крови и повышению АД. Возможно сочетание обоих патологических процессов.

ГИПОНАТРИЕМИЯ

Гипонатриемия встречается в клинике значительно чаще, сопровождая разнообразные патологические состояния. Наибо-

лее частая причина гипонатриемии — применение диуретиков. Большинство диуретических препаратов активирует экскрецию натрия с мочой. Последствием этого может быть снижение общего содержания натрия в организме и уменьшение внеклеточного водного пространства.

Низкая концентрация натрия в плазме крови характерна для некоторых заболеваний почек, когда почки утрачивают способность реабсорбировать катион из гломерулярного фильтрата. Это может сопровождаться и нарушением секреции воды. Гипонатриемия характерна и для застойной сердечной недостаточности, главным образом потому, что пациенты с сердечной недостаточностью в течение длительного времени получают диуретические препараты. В начальных стадиях патологического процесса застойная сердечная недостаточность *per se* сопровождается гипонатриемией. Это происходит в силу того, что снижение сердечного выброса воспринимается мозгом как уменьшение объема крови, вследствие чего происходит активация секреции антидиуретического гормона. Дополнительное условие снижения экскреции воды — падение тока крови через почки.

Гипонатриемия сопровождает и патологию ЖКТ. Диарея может снижать содержание натрия в сыворотке крови и экстрацеллюлярной жидкости. Наличие илеостомы всегда сопровождается гипонатриемией. При циррозе печени, несмотря на высокое содержание натрия в организме, содержание его в плазме крови может быть снижено. Первичная недостаточность надпочечников (болезнь Аддисона) сопровождается очень низкой секрецией всех гормонов, включая альдостерон. В этих условиях большое количество натрия экскретируется с мочой с развитием выраженной гипонатриемии. При сахарном диабете наличие кетоацидоза сопровождается усиленной потерей натрия в почках. В результате этого развивается гипонатриемия и снижается содержание натрия в организме. Гипонатриемия сопровождает и выраженную гипергликемию.

КАЛИЙ

В организме человека с массой тела 70 кг содержится примерно 3500 ммоль калия. Калий (K^+) — основной катион внутриклеточной жидкости, в ней содержится 98% калия всего организма.

K^+ обеспечивает осмолярность цитоплазмы и создает условия для протекания в ней биохимических реакций. В клинической биохимии обмен калия оценивают на основании его содержания в плазме крови (внутрисосудистый пул), хотя в нем содержится не более 2% общего количества катиона. Тем не менее изменения содержания калия в плазме крови достоверно отражают сдвиги его концентрации как в межклеточной жидкости, так и в тканях.

В ряде ситуаций исследуют содержание калия внутри клеток. Учитывая, что более 60% калия содержится в миоцитах поперечнополосатых мышц, также проводят исследование биоптатов. В условиях переедания, почечной недостаточности содержание калия в ткани меняется; только сердечная мышца в относительной степени защищена от истощения запасов калия. Основная причина изменения содержания внутриклеточного содержания калия — нарушение КЩР.

Использование клеток крови (эритроциты, лейкоциты) для оценки внутриклеточного содержания калия имеет ряд преимуществ. Вместе с тем даже в физиологических условиях содержание калия в эритроцитах слабо коррелирует с его содержанием в клетках тканей. Однако потоки калия в лейкоцитах происходят в 70–80 раз активнее, чем в эритроцитах, возможно, поэтому концентрация калия в лимфоцитах в большей мере, чем в эритроцитах, соответствует его содержанию в клетках тканей. Внутриклеточная гипокалиемия у пациентов с почечной недостаточностью и недостаточностью кровообращения установлена именно на основании определения содержания калия в лимфоцитах.

Поступивший в организм калий распределяется среди тканей тела в течение 24–30 ч; поступление катиона в эритроциты происходит более медленно. В костной ткани существует пул необмениваемого калия, но он мал. Поступление K^+ в клетку через плазматическую мембрану определено многими факторами. Калиевые каналы обеспечивают пассивную проницаемость мембраны для катиона, при этом движение K^+ определено величиной электрического потенциала и градиентом концентрации. Калиевые каналы могут находиться в открытом и закрытом состоянии, пассивный поток K^+ в клетку зависит именно от количества открытых в данный момент каналов. Высокая проницаемость мембран клеток для K^+ , особенно в состоянии возбуждения,

и относительная непроницаемость для Na^+ приводят к возникновению разности потенциалов по обе стороны плазматической мембраны.

Клиническое значение

Стабильность содержания калия в организме — следствие сбалансирования процессов его поступления и выделения. Поступление калия с пищей — самый важный фактор в регуляции общего пула катиона. Взрослый человек потребляет ежедневно 80–100 ммоль калия. От 85 до 90% калия, принятого с пищей, экскретируют почки. При отсутствии калия в пище в течение нескольких дней с мочой выделяется 40–60 ммоль/сут, после чего потеря калия с мочой уменьшается до 10–20 ммоль/сут. 10–15% потребленного с пищей калия выводится через ЖКТ. Этот путь выведения катиона усиливается при гиперсекреции минералокортикоидов и почечной недостаточности. Через кожу значительное количество калия может быть выделено только в случае интенсивного потоотделения.

Ионы калия легко проходят через фильтрационный барьер почечных телец. Содержание его в первичном фильтрате соответствует таковому в плазме крови при учете различия в содержании белка. Далее 50–70% калия реабсорбируется в проксимальном (извитом) сегменте нефрона. Экскреция калия — результат сочетания процессов фильтрации, реабсорбции и секреции. При патологии большое значение имеют внепочечные пути выделения калия. В условиях гиперкалиемии в извитых канальцах подавляется реабсорбция как калия, так и воды.

Все факторы, которые могут изменить электрохимический потенциал мембраны клеток извитого канальца, оказывают влияние на экскрецию калия. К ним относят КЩР, скорость протекания мочи по дистальному канальцу, действие минералокортикоидов, поступление нереабсорбируемых в дистальном канальце анионов бикарбоната при почечном канальцевом ацидозе, некоторые антибиотики.

Альдостерон увеличивает поступление калия в клетки и экскрецию его с мочой, контролируя реабсорбцию в дистальных канальцах. При недостаточности коры надпочечников экскреция калия с мочой снижается и может развиваться гиперкалиемия. В то

же время при гиперактивности коры надпочечников (гиперальдостеронизме) усиленная реабсорбция натрия приведет к повышенному выделению калия и угрожающей гипокалиемии (2,4–1,6 ммоль/л). Существенное влияние на уровень калия в плазме крови оказывает нарушение рН крови. Так, метаболический ацидоз вызывает перемещение ионов водорода внутрь клетки в обмен на внутриклеточный калий, что приводит к тканевой гипокалиемии. При алкалозе, наоборот, развивается гиперкалиемия. На уровень калия в плазме влияет содержание в крови аниона HCO_3^- , отражающее степень катаболических процессов.

Экскреция калия в почках имеет циркадный ритм, наименьшие ее значения отмечены в ночное время, что отражает ритм секреции глюкокортикоидов. Экскреция K^+ быстро возрастает в ответ на нагрузку этим катионом. Гиперкалиемия в свою очередь стимулирует секрецию альдостерона. Альдостерон определяет транспорт калия в почках, а также в толстой кишке, слюнных и потовых железах. Введение большой дозы глюкокортикоидов вызывает гипокалиемию и усиливает калийурез, который продолжается значительно дольше действия стероидов.

Повышение концентрации инсулина в крови сопровождается снижением содержания калия, что происходит в результате поглощения калия миоцитами скелетных и сердечной мышц, клетками печени и жировой ткани. При сахарном диабете гиперкалиемия развивается легче, чем в норме. Инсулин способствует накоплению внутриклеточного калия независимо от уровня глюкозы в крови. Гиперкалиемия в свою очередь активирует секрецию инсулина клетками островков Лангерганса. При снижении или повышении содержания калия в крови нарушается поступление в клетки глюкозы и аминокислот.

ГИПОКАЛИЕМИЯ

Недостаточное потребление калия редко вызывает гипокалиемию, повышенная экскреция калия почками — наиболее частая причина гипокалиемии. Прием лакрицы или ее производных может спровоцировать клиническую картину первичного гиперальдостеронизма, поскольку содержащаяся в лакрице глицерризиновая кислота обладает минералокортикоидной активностью. В таких случаях показано определение в крови содержания аль-

достерона и активности ренина. При первичном гиперальдостеронизме избыток альдостерона угнетает секрецию ренина. При приеме производных лакрицы в крови понижаются содержание как альдостерона, так и ренина.

Вторичные формы гиперальдостеронизма характеризуются повышением в крови уровня ренина и альдостерона. Это происходит при стенозе почечной артерии, злокачественной гипертензии, длительном приеме пероральных контрацептивов (синтетических эстрогенов и прогестинов), наличии ренинпродуцирующей опухоли (гемангиоперицитомы).

Таким образом, выраженная гипокалиемия развивается при снижении поступления калия с пищей; усиленной экскреции калия почками при приеме диуретиков, диуретической фазе острой почечной недостаточности, гиперальдостеронизме, синдроме и болезни Кушинга, внепочечной потере калия при диарее, профузной рвоте; перераспределении калия между вне- и внутриклеточной жидкостью.

Гипокалиемию в условиях перемещения катиона в клетку отмечают при остром и хроническом метаболическом ацидозе; остром дыхательном алкалозе; введении инсулина или глюкозы; семейном гипокалиемическом параличе и пароксизмальных миопатиях, а также при некоторых эндокринных заболеваниях.

Клетки нервной системы быстро реагируют на уровень калия в плазме, чем можно объяснить раннее появление неврологической симптоматики. Первые признаки дефицита калия — ослабление рефлексов, гипотония мышц, слабость и астения. Некоторые случаи гипокалиемии приводят к явлениям паралича и даже рабдомиолиза. Ослабление тонуса гладкой мускулатуры при низком уровне калия может вызвать атонию желудка и парез кишечника, особенно на 2–3-й день послеоперационного периода.

В условиях гипокалиемии содержание калия в миоцитах миокарда снижается медленнее, чем в скелетных мышцах. Выраженная гипокалиемия сопровождается возникновением нарушения проводимости и ритма, что отражается на ЭКГ (уменьшение амплитуды зубцов, инверсия зубца T , расширение интервала $S-T$ и появление зубца U). При хроническом дефиците калия увеличиваются размеры сердца, возникают нарушения ритма,

а при резком снижении уровня калия в плазме возможна остановка сердца в систоле.

Для выявления причины гипокалиемии необходимы подробный сбор анамнеза и результаты лабораторного исследования. В анамнезе обращают внимание на прием диуретиков, слабительных, препаратов лакрицы, рвоту, диарею. При лабораторном обследовании определяют в плазме крови концентрацию калия и натрия, показатели КЩР. В качестве антикоагулянта при определении калия и натрия применяют не натриевую, а литиевую соль гепарина, стараются избегать гемолиза. Одновременно с исследованием концентрации калия плазмы крови часто определяют содержание катиона в суточной моче. Если за сутки больной выделяет с мочой менее 20–30 ммоль калия, причина гипокалиемии внепочечная, большие потери калия с мочой связаны с патологией почек. Желательно исследовать концентрацию альдостерона и активность ренина. Определение в крови концентрации магния и кальция показано в случаях неясной причины гипокалиемии.

Электrolитные нарушения отмечают у многих пациентов, интенсивно потребляющих алкоголь. Гипокалиемия может возникать у алкоголиков даже при небольшом повышении в крови содержания натрия. Употребление большого количества пива также приводит к гипокалиемии и гипонатриемии; в пиве содержится очень мало солей. Гипонатриемия у алкоголиков не сопровождается избытком альдостерона.

ГИПЕРКАЛИЕМИЯ

Усиленное потребление калия с пищей редко вызывает гиперкалиемию, если при этом нет почечной или надпочечниковой недостаточности. Гиперкалиемия может развиваться при повышенном поступлении калия (прием избытка калия при терапии диуретиками, переливание крови с просроченным сроком хранения); перераспределении калия между водными пространствами (повреждение тканей, активация катаболических процессов, системный ацидоз); снижении выведения калия (острая почечная недостаточность, хроническая почечная недостаточность, длительный прием калийсберегающих диуретиков, гипоальдостеронизм).

Гиперкалиемия при недостаточности надпочечников (болезнь Аддисона) сопровождается низким уровнем натрия в плазме крови, гипокалиурией, высокой активностью ренина. Гиперкалиемия при селективной недостаточности альдостерона сопровождается низким уровнем ренина и нарушением секреции кортизола. Нарушения метаболизма углеводов при острой и хронической почечной недостаточности провоцируют гиперкалиемию и метаболический ацидоз.

Симптомы гиперкалиемии зависят от скорости нарастания содержания катиона в плазме и связаны с изменениями мембранного потенциала нейронов и мышечных клеток. Нейромышечные симптомы гиперкалиемии выражаются в парестезиях, а в более тяжелых случаях в восходящем параличе конечностей. Выраженность кардиальных симптомов зависит от степени повышения калия в плазме — от минимальных изменений на ЭКГ до серьезных нарушений ритма и проводимости (поперечная блокада и фибрилляция желудочков). При концентрации калия выше 6 ммоль/л, как правило, обнаруживают изменения на ЭКГ, которые при прогрессировании гиперкалиемии становятся более тяжелыми. При концентрации калия выше 10 ммоль/л сердце может остановиться в диастоле. Гиперкалиемия (более 5 ммоль/л) отмечена в большом проценте случаев у детей, родившихся недоношенными. При уровне калия выше 7 ммоль/л могут развиваться аритмии сердца с летальным исходом. В клинической практике продолжительная гиперкалиемия чаще всего происходит в результате хронической почечной недостаточности.

Гиперкалиемия требует неотложной диагностики. Необходимо определить, нет ли явлений гиповолемии, исследовать содержание электролитов повторно. Следует рационально определить газовый состав крови, провести функциональные пробы почек, исследовать параметры КЩР, определить активность ренина и оценить функцию надпочечников. Наибольшую опасность для пациента представляет острое повышение концентрации калия более 7 ммоль/л, что требует экстренной диагностики и длительного наблюдения. Однако следует отметить, что снизить высокое содержание калия в плазме крови достаточно трудно; в тяжелых случаях прибегают к гемодиализу.

Частая причина повышенного содержания калия в плазме крови — несоблюдение условий взятия крови. Наиболее частая ошибка — гемолиз. В ряде случаев при внутривенном введении калия по окончании инфузии из этой же иглы (катетера) берут кровь для исследования. В таких ситуациях лаборатория может определить содержание калия в плазме крови, превышающее 10 ммоль/л. При большом количестве тромбоцитов или лейкоцитов, что происходит при миелопролиферативных заболеваниях, может возникнуть псевдогиперкалиемия в результате повышенного выхода калия из клеток в случае определения калия в сыровотке крови, а не в плазме.

Методы определения натрия и калия

Концентрацию натрия и калия измеряют сходными способами: методом пламенной атомно-эмиссионной спектроскопии (ПАЭС), потенциометрически при помощи ионоселективных электродов (ИСЭ), атомно-абсорбционной спектрометрией.

Физиологический эффект ионов зависит от их концентрации (активности) в объеме воды, в котором они растворены. В сыровотке крови содержится обычно 93,5% воды, 5,4% белка, 0,6% липидов и 0,9% других молекул. Соответственно при заболеваниях, изменяющих объем воды в сыровотке, физиологический контрольный механизм будет способствовать поддержанию на постоянном уровне отношения активности ионов к объему воды. Однако если объем водной фракции уменьшается, как это происходит при гиперпротеинемии или гиперлипидемии, действительная концентрация ионов в общем объеме пробы уменьшится, хотя эффективная активность ионов в объеме воды останется нормальной. При использовании методов ПАЭС эти физиологические факторы ответственны за появление псевдогипонатриемии или псевдогипохлоремии, наблюдаемых в этих случаях. При гиперпротеинемии лучше использовать метод ИСЭ. В этом случае наличие объемной ошибки не сопровождается трудностями клинической интерпретации для ионов калия, поскольку интервал нормальных значений концентрации калия в сыровотке достаточно велик и составляет 33% (3,6–5 ммоль/л). Интересно, что для натрия интервал нормальных значений концентрации

в сыворотке крови (135–145 ммоль/л) составляет только 7%. Гиперпротеинемия и гиперлипидемия также увеличивают вязкость сыворотки, что может вызвать ошибки при разведении образца.

Метод ПАЭС обычно требует разведения пробы 1 : 100 или 1 : 200 дилуентом, содержащим внутренний стандарт. В качестве внутреннего стандарта наиболее часто используют литий (15 ммоль/л) или цезий (1,5 ммоль/л). Метод позволяет определять концентрацию ионов в общем объеме образца.

При нагревании в пламени пропана испаряется соль, которая получает электроны из восстанавливаемых газов с образованием атомов натрия и калия, нагреваемых в пламени, что приводит к формированию возбужденных атомов натрия и калия. Возбужденные атомы немедленно приходят в спокойное состояние, что сопровождается выделением света (эмиссией). Эмиссию натрия можно регистрировать при длине волны 589 нм, калия — при 766 нм. Количество выделенного света прямо пропорционально концентрации натрия или калия. Хотя только 1–5% атомов в пламени возбуждается для эмиссии, это достаточно точный и воспроизводимый метод.

Имеется несколько факторов, влияющих на определение калия и натрия в биологических жидкостях методом ПАЭС. Относительно высокая концентрация натрия будет оказывать влияние на определение калия вследствие воздействия на степень ионизации атомов калия в пламени. Степень влияния зависит от соотношения натрия и калия в калибраторе и пробах. Поскольку не отмечена клиническая корреляция между уровнем натрия и калия в сыворотке, то калибровка стандартным раствором (140 ммоль Na/л и 5 ммоль K/л), отражающая нормальный состав сыворотки, уменьшает вероятность ошибки. Влияние ионизации больше ощущается при проведении анализов мочи, но это не имеет клинического значения вследствие большого разброса нормальных значений.

Метод ИСЭ требует использования стеклянной ионообменной мембраны для определения натрия и мембраны валиномицина с нейтральными носителями для определения калия. Обычные натриевые электроды имеют в 1000 раз большую специфичность для натрия, чем для калия. Хотя отношение Na/K в сыворотке приблизительно равно 30, электрод для определения калия также

имеет высокую специфичность, что устраняет влияние натрия на результаты. Определение ионов может быть проведено прямым (в неразведенной пробе) или косвенным (при разведении образца) способом. Прямые методы не испытывают влияния гиперпротеинемии и гиперлипидемии, тогда как разведение таких проб может привести к ошибке. Прямой метод ИСЭ выгоднее применять при определении ионов в цельной крови, косвенный метод — при исследовании малых объемов пробы. Определение ионов в моче методом ИСЭ имеет ограниченную линейность и подвержено влиянию ионного состава мочи.

Атомно-абсорбционная спектрофотометрия. Концентрация натрия и калия может быть определена атомно-абсорбционной спектрофотометрией. Разведенную пробу помещают в пламя, металлы испаряются, и их атомы восстанавливаются до основного состояния. Монохроматический свет специфической линии резонанса (766,5 нм для калия и 589,0 нм для натрия), образуемый полым катодной лампой, проходит через пламя и поглощается атомами. Измеряют количество поглощенного света, пропорциональное концентрации металла. Атомная абсорбция имеет большую чувствительность, но меньшую воспроизводимость и не используется в клинических лабораториях.

В рутинных лабораториях ранее самым распространенным методом определения натрия и калия была ПАЭС, однако в настоящее время возрастает число лабораторий, использующих метод ИСЭ.

Референсный метод определения натрия и калия — ПАЭС. Единственный значительный недостаток ПАЭС, также как и косвенного метода ИСЭ, — влияние объема водной фракции сыворотки при некоторых заболеваниях. Прямой метод ИСЭ не подвержен влиянию этого фактора, но может приводить к ошибке при калибровке вследствие электрохимических различий водного стандарта и сыворотки.

ФОСФОР

Фосфор — один из элементов, участвующий в построении тканей организма; в организме человека содержание фосфора составляет около 650 г. Фосфор содержится в большом спектре ор-

ганических и неорганических веществ, что отражает и различие биохимической активности его соединений. Основные процессы, в которых соединения фосфора играют важную роль: метаболизм костной ткани, обмен углеводов, метаболизм липидов, построение мембран. Наибольшее диагностическое значение имеет определение в крови неорганического фосфора. В сыворотке крови неорганический фосфор представлен ионами HPO_4^{2-} и H_2PO_4^- ; содержание иона PO_4^{3-} при физиологических значениях pH крови незначительно.

Ежедневная потребность в фосфоре составляет 1000–2000 мг (у взрослых); содержание его в пище достаточно. Особенно богаты фосфором молоко и молочные продукты, мясо, яйца; дефицит фосфора в пище практически не наблюдается. Всасывание фосфора в наибольшей степени происходит в тощей кишке. Снижение активности этого процесса отмечено в условиях повышенной кислотности желудочного сока, приеме некоторых лекарственных препаратов (гидроокись алюминия), при увеличении содержания в пище кальция вследствие образования с фосфором в кишечнике нерастворимых соединений.

В норме у взрослых большая часть фосфора, абсорбированного в кишечнике, элиминируют почки. В случае низкого содержания фосфора в крови уровень экскреции его с мочой может быть даже ниже чувствительности используемых в лабораториях методов. Около 90% фосфора в крови проходит через фильтрационный барьер почечных телец, оказываясь в первичной моче, затем фосфаты фактически полностью (88–96%) реабсорбируются в проксимальных канальцах нефрона. Среди индексов, используемых для оценки экскреции фосфора, наиболее часто рассчитывают клиренс фосфора.

Клиническое значение

ГИПОФОСФАТЕМИЯ

Гипофосфатемия развивается при недостатке витамина D_3 , вызванном стеатореей. В этих условиях экскреция с калом жиров приводит к потере витамина D. У взрослых это наиболее частая причина недостатка витамина D и развития гипофосфатемии.

Мальабсорбция возникает при ряде заболеваний печени и поджелудочной железы.

Выраженная гипофосфатемия наблюдается при синдроме первичного гиперпаратиреоза, связанного с гиперпродукцией ПТГ паращитовидными железами. В этих условиях ингибирована реабсорбция фосфатов в канальцах и, следовательно, увеличена его экскреция, повышен клиренс фосфатов с возникновением гиперкальциемии в условиях резорбции костной ткани с развитием остеопороза.

В отличие от специфических форм выраженной гипофосфатемии умеренное снижение фосфатов крови можно отметить при многих заболеваниях почек (в том числе тубулопатиях). При этом реабсорбция фосфатов снижается на уровне проксимальных канальцев нефрона; развивается фосфатурия, сопровождаемая снижением содержания фосфатов в крови.

Гипофосфатемия — симптом почечного тубулярного ацидоза (как наследственного, так и приобретенного), для которого характерны развитие метаболического ацидоза и повышение экскреции с мочой как фосфора, так и кальция. В условиях почечного тубулярного ацидоза в качестве компенсаторного механизма активируется секреция ПТГ, что усложняет дифференциальную диагностику первичного и вторичного гиперпаратиреоза.

ГИПЕРФОСФАТЕМИЯ

Столь же часто (как и гипофосфатемия) в клинической биохимии отмечают случаи гиперфосфатемии. К ним относят первичный гипопаратиреоз, псевдогипопаратиреоз, хроническую почечную недостаточность и метастазы в кости.

Методы определения

Определение содержания фосфора в сыворотке крови основано на том, что неорганические фосфаты, но не стабильные эфиры фосфорной кислоты способны реагировать с молибдатом в кислой среде с образованием комплексной соли фосфомолибдата аммония, имеющей слабо-желтую окраску. Это соединение можно определить непосредственно по пику абсорбции при длине волны 340 нм или после восстановления в молибденовый синий

в диапазоне длин волн 640–750 нм, возможно и образование комплексов с другими красителями.

Количество экскретируемого с мочой фосфора колеблется от 0,3 до 1,3 г в сутки у взрослых людей и зависит от возраста, уровня физической активности и содержания фосфора в пище.

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Многочисленные методы, основанные на восстановлении молибденового синего, отличаются в основном видом примененного восстановителя; он должен восстанавливать только фосфорно-молибденовый комплекс, но не избыток молибдата в среде. Каждый из примененных восстановителей оказывает влияние на специфичность метода, его чувствительность, стабильность образованного окрашенного комплекса, формирование которого может происходить разными путями. В целом методы, основанные на восстановлении фосфорно-молибденового комплекса в молибденовый синий, имеют линейность в ограниченном диапазоне концентраций определяемого вещества, слабую чувствительность и воспроизводимость; автоматизация их затруднена. Несмотря на недостатки, в настоящее время эти методы используют в практике работы клинических лабораторий.

Недостаток всех химических методов — проведение реакции в кислой среде, что сопровождается гидролизом стабильных эфиров фосфорной кислоты. Метод, лишенный этих недостатков, — измерение оптической плотности при 340 нм фосфорно-молибденового комплекса без применения восстановителей. Метод прост, легко поддается автоматизации. В настоящее время метод адаптирован к большинству биохимических автоанализаторов.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ

Ферментативный метод определения неорганического фосфора предложен в 1967 г., в качестве субстрата используется гликоген. После ряда сопряженных ферментативных реакций количество образующегося НАДФН измеряют спектрофотометрически при длине волны 340 нм; оптическая плотность инкубационной среды пропорциональна концентрации неорганического фосфора. Этот метод, описанный для анализа фосфатов в тканях, модифицирован позднее для определения ионов в сыворотке крови и моче.

Описан также ферментативный метод, основанный на использовании пуриннуклеозидфосфорилазы (КФ 2.4.2.1), ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2) при прямой спектрометрии мочевой кислоты при длине волны 293 нм. Мочевая кислота образуется при действии упомянутых ферментов в реакции инозина с неорганическим фосфатом. Все этапы определения проводят в одной кювете, высокая чувствительность метода позволяет использовать микроколичества исследуемого материала. Реакция протекает в течение короткого промежутка времени (5 мин при температуре 37 °С), что сокращает время исследования, к тому же не требует депротеинизации. Линейность реакции сохраняется в пределах пятикратного превышения нормального уровня фосфора в сыворотке крови. Несмотря на ряд примененных в методе ферментов, стабильность реагентов достаточно высокая. Для анализа мочи требуется предварительное разбавление пробы дистиллированной водой. Большое преимущество метода — возможность адаптации к биохимическим анализаторам; метод можно выполнить в режиме монореагента, в технике конечной точки или кинетического определения.

Необходимость спектрофотометрии в УФ-области можно преодолеть при использовании колориметрии. Предложено измерять перекись водорода, образуемую одновременно с мочевой кислотой в процессе окисления гипоксантина ксантиноксидазой. Для этого используют формирование хромогена в системе, содержащей 4-аминофеназон и фенол, в которой в присутствии H_2O_2 образовывался красный комплекс хинонимина.

Ферментативные методы определения неорганического фосфора имеют значительные преимущества перед химическими: высокая чувствительность и специфичность, увеличение скорости исследования, возможность использования малых количеств образцов, легкость автоматизации. Тем не менее многие ферментативные методы определения фосфора имеют ограничения: необходимость УФ-спектрометрии и недостаточная стабильность ферментов затрудняет их использование. Ферментативный колориметрический метод определения неорганического фосфора в биологических жидкостях удовлетворяет всем требованиям клинко-диагностических лабораторий в плане линейности, чувствительности, специфичности и простоты использования.

РЕФЕРЕНСНЫЕ МЕТОДЫ

Общепринятого референсного метода определения неорганического фосфора нет. Среди существующих реакций с молибденовым комплексом без последующего восстановления спектрофотометрия при длине волны 340 нм обладает высокой аналитической надежностью и может быть использована в качестве референсного метода.

Другая группа методов основана на использовании фосфорно-молибденованадиевого комплекса. В этом случае нет необходимости использовать восстановители, так как комплекс имеет окраску, однако из-за низкого значения рабочего раствора фосфорные эфиры подвергаются частичному гидролизу, что завышает результаты на 0,2–0,3 мг/дл. Кроме того, метод имеет более низкую чувствительность, чем формирование молибденового синего.

1.4. ФЕРМЕНТЫ

АЛАНИН- И АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗА

Метаболическое превращение оксикислот в аминокислоты было установлено в начале XX века, но только в 1937 г. отечественные ученые Браунштейн и Крицман доказали существование специфичного фермента — аспаратаминотрансферазы.

Аспаратаминотрансфераза (АСТ; глутамат-оксалоацетат-трансаминаза; GOT L-аспартат: 2-оксоглутаратаминотрансфераза, КФ 2.6.1.1) катализирует реакцию переаминирования (трансаминирования) между аспартатом и α -кетоглутаратом:

α -Кетоглутарат + L-аспартат $\leftrightarrow$ L-глутамат + оксалоацетат.

У млекопитающих наиболее высокая активность и концентрация АСТ отмечена в печени, нервной ткани, скелетной мускулатуре и миокарде. Незначительная активность АСТ определена и в крови здоровых людей. В большинстве тканей существует как минимум 2 изофермента АСТ: митохондриальный изофермент (мАСТ), на всех поддерживающих средах движущийся к катоду, и растворимый в цитозоле изофермент АСТ (цАСТ), мигрирующий к аноду. цАСТ состоит из 2 идентичных субъединиц;

это димер с молекулярной массой 93 кД. мАСТ — тоже димер с молекулярной массой 91 кД. Выделение изоферментов выявило существование нескольких изоформ со сходной кинетикой, но выраженными иммунологическими различиями. Изоферменты АСТ имеют некоторое различие кинетических характеристик: оптимум действия мАСТ более низкий, чем цАСТ.

Аланинаминотрансфераза (АЛТ; глутамат-пируваттрансаминаза; GPT, L-аланин: 2-оксоглутаратаминотрансаминаза, КФ 2.6.1.2) катализирует реакцию переаминирования между L-аланином и α -кетоглутаратом:



АЛТ — вторая активная аминотрансфераза, выделенная из тканей человека. АЛТ присутствует во многих органах: печени, почках, скелетных мышцах, миокарде, поджелудочной железе. Невысокая активность АЛТ отмечена и в сыворотке крови здоровых людей. Как и АСТ, АЛТ присутствует в клетках в форме 2 изоферментов — цитозольного и митохондриального, но последний нестабилен, содержание его в клетке низкое.

Клиническое значение определения концентрации аминотрансфераз

Повышение активности аминотрансфераз отмечено при ряде патологических процессов, в которые вовлечена печень. Активность АСТ и АЛТ повышена при остром панкреатите, холецистите, паразитарных заболеваниях, псориазе, ожогах, применении пропионлактона как противовирусного средства, перегрузке организма железом, гепатобилиарной патологии. В условиях пересадки почек и последующей терапии циклоспорином и азатиоприном активность как АЛТ, так и АСТ оказывается повышенной. Введение азатиоприна в большей степени, чем циклоспорина, повышает активность АСТ и АЛТ, свидетельствуя о гепатотоксическом действии препаратов. Увеличение активности аминотрансфераз можно отметить и у здоровых людей при диете, богатой белком или содержащей 25–30% сахарозы, а также у доноров.

Большое практическое значение имеет упоминание лекарственных препаратов, обладающих невыраженным гепатотокси-

ческим свойством. К ним на основании накопленного многими исследователями опыта относят аспирин, индометацин, линкомицин, анаболические стероиды, пероральные контрацептивы, ингибиторы МАО, тестостерон и другие андрогены, прогестерон, сульфаниламиды, пиридоксин, барбитураты, препараты меди и железа, антибиотики (эритромицин, гентамицин, ампициллин, тетрациклин).

Активность АСТ в крови возрастает при туберкулезе легких, септицемии, герпетической инфекции, вирусном гепатите, опухолях разной локализации.

Активность АСТ снижается при малярии и беременности, не меняется при эмболии легочной артерии, пневмониях, абсцессах легкого, ревматоидном артрите. Активность АСТ повышается при приеме анаболических стероидов, андрогенов, пероральных контрацептивов, анестетиков и опиатов, антибиотиков, обладающих гепатотоксическим свойством, клофибрата. Увеличение активности АЛТ отмечено у пациентов при терапии некоторыми лекарственными средствами, особенно антибиотиками, гипополидемическими препаратами, кетоацидозе, азотемии.

Исследование отношения мАСТ/общая активность АСТ также было предложено в качестве диагностического теста. Отношение мАСТ/общая активность АСТ снижено при общем гепатите и не изменено при обтурации желчных протоков, алкогольном поражении печени, метастазах в печень. Появление в сыворотке крови высокой активности мАСТ свидетельствует о некротических процессах в гепатоцитах. Однако эти исследования не нашли широкого применения в клинической химии, так как диагностическая чувствительность и специфичность исследования мАСТ оказались не выше, чем общая активность АСТ и АЛТ.

В остром периоде инфаркта миокарда повышение активности АСТ — достоверный диагностический тест. В то же время активность АСТ повышена в значительно меньшей степени, чем активность КК или ЛДГ. Ретроспективный дискриминационный анализ выявил хорошую клиническую чувствительность и специфичность исследования активности АСТ (на уровне 73%). Клинико-морфологические исследования показали, что динамику активности АСТ можно использовать для расчета объема поражения при инфаркте миокарда при небольших очагах некроза

миоцитов столь же достоверно, как и на основании активности КК.

Предложено использовать повышение активности АСТ в сыворотке крови как прогностический тест при остром лейкозе.

Методы определения аминотрансфераз

Много методических приемов было предложено для исследования общей активности АСТ: хроматографическое исследование аминокислот в инкубационной среде, реакция оксалоацетата с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), определение сформированного глутамата при действии глутаматдегидрогеназы (ГлДГ). В качестве унифицированного в России утвержден метод Райтмана–Френкеля, в котором оксалоацетат, образованный при переаминировании L-аспартата и α -кетоглутаровой кислоты, в щелочной среде превращается в пируват, который в реакции с 2,4-ДНФГ образует гидразон пирувата, оптическую плотность которого измеряют при длине волны 540 нм. Наиболее удобный аналитический спектрофотометрический метод, нашедший широкое применение, предложен Карменом. В этом методе образовавшийся в результате переаминирования оксалоацетат восстанавливают в малат с одновременным окислением НАДН при действии малатдегидрогеназы и измеряют кинетику оптической плотности НАДН при длине волны 340 нм. Специфические субстраты АСТ — L-аспартат или L-глутамат, хотя L-тирозин и некоторые аналоги аспартата также могут быть субстратом для фермента. Специфический ингибитор АСТ — аналог аспартата (винилглицин). Раздельное исследование активности цАСТ и мАСТ можно провести, используя хроматографические методы, а также методы ЭФ и иммуноингибирования.

Другой метод — титрование специфическим ингибитором винилглицином, который позволяет достичь наилучшего приближения к абсолютному референсному методу.

Методы исследования активности АЛТ в биологических жидкостях сходны с АСТ, особенно в колориметрическом методе Райтмана–Френкеля. В наиболее предпочтительном методе ультрафиолетовой кинетики (длина волны 340 нм) образованный при переаминировании аланина и α -кетоглутарата пируват вос-

становливают в лактат с одновременным окислением НАДН, катализируемым ЛДГ. Преимущества метода следующие: а) возможность использовать для расчета активности фермента коэффициент молярной экстинкции НАДН; б) высокая степень специфичности; в) возможность учитывать степень ингибирования реакции при накоплении в инкубационной среде пирувата. После незначительной лаг-фазы снижение оптической плотности инкубационной среды при 340 нм пропорционально активности АЛТ.

В качестве кофермента в реакции переаминирования, осуществляемой обоими ферментами, выступает витамин В₆ (пиридоксин), в ходе реакции превращающийся в физиологически активную форму — пиридоксаль-5-фосфат (П-5-Ф). Добавление в сыворотку крови П-5-Ф приводит к повышению активности как АСТ, так и АЛТ. В крови здоровых людей при добавлении П-5-Ф отмечена отрицательная корреляционная зависимость между содержанием в крови П-5-Ф и активностью АСТ и АЛТ. Витамин В₆ широко представлен в пищевых продуктах, но разрушается при приготовлении пищи. Содержание П-5-Ф в крови снижается с возрастом, поэтому активность АСТ и АЛТ у лиц старше 64 лет на 30% ниже, чем в возрасте 46–63 лет. В старшей группе выявлено наиболее значительное повышение активности АСТ и АЛТ при добавлении в инкубационную среду П-5-Ф (19% по сравнению с 6,5% в более молодой группе). Содержание витамина В₆ в сыворотке крови оказывает выраженное влияние на активность АСТ, АЛТ и их соотношение. Следует заметить, что у здоровых людей коэффициент вариации активности АСТ значительно выше, чем АЛТ.

Для исследования активности АСТ предпочтительно использовать свежую сыворотку крови, взятую в условиях минимального стаза. Можно применять и плазму крови, полученную при добавлении гепарина не более 0,2 мг/мл, ЭДТА (1 мг/мл), фторида (2 мг/мл), оксалата (1 мг/мл) и цитрата (1 мг/мл).

АМИЛАЗА

α -Амилаза [α -(1,4)-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1] — фермент, гидролизующий внутренние 1,4- α -гликозидные связи крахмала, гликогена и других полимеров глюкозы. В организ-

ме человека основные источники α -амилазы — поджелудочная и слюнные железы. Многочисленные изоформы, выделенные из биологических жидкостей и тканей человека, представляют собой, вероятно, гетерогенные продукты посттрансляционных изменений двух семейств изоферментов амилазы, синтез которых кодируют 2 локуса гена *Amy-1*, слюнной (С) тип амилазы и *Amy-2*, панкреатический (П) тип фермента, тесно связанные в хромосоме 1. Изоферменты С и П не имеют больших различий в аминокислотном составе. Гель-фильтрацией на сефадексе во фракции С-амилаз выделены 2 изоформы, одна из которых содержит углеводы. Молекулярная масса изоформ, содержащих углеводы, 57 кД, не содержащих углеводы — 55 кД. Изоэлектрические точки основных изоформ С-изоамилаз от 5,5 до 6,5. П-группа изоамилаз имеет меньшую молекулярную массу (53 кД) и не содержит углеводов. Изоэлектрические точки этих белков варьируют от 5,7 до 7,0.

Убедительным доказательством того, что П-тип амилазы образуется только в поджелудочной железе, служит отсутствие этого изофермента у лиц с тотальной панкреатэктомией. С-изофермент α -амилазы, напротив, может быть синтезирован в разных органах и тканях. Высокая активность С-амилазы зафиксирована в ткани фаллопиевых труб и содержимом кисты яичников. Специфическая группа изоамилаз, продуцируемых тканями женских половых органов, не выявляется в сыворотке крови или моче здоровых людей; распределение изоамилаз идентично у мужчин и женщин. Изоамилазы, принадлежащие к С-группе, обнаружены и в женском молоке. В раневой жидкости также содержатся амилазы, относящиеся к С-группе.

Клиническое значение определения активности амилазы в сыворотке крови

Определение активности α -амилазы в сыворотке крови — наиболее распространенный тест диагностики острого панкреатита. При остром панкреатите активность фермента в сыворотке крови возрастает через 3–12 ч после болевого приступа, достигает максимума через 20–30 ч и возвращается к норме при благоприятном течении в пределах 4 дней. Активность α -ами-

лазы (диастазы) в моче возрастает через 6–10 ч после подъема активности в сыворотке и возвращается к норме чаще всего через 3 дня после подъема.

В настоящее время широко известно, что увеличение общей активности α -амилазы неспецифично для панкреатита и других заболеваний поджелудочной железы. Клинические исследования показали, что повышение активности α -амилазы происходит при ряде заболеваний, к которым относят кишечную непроходимость, заболевания желчных путей, аппендицит, паротит, внематочную беременность. Исследования активности α -амилазы в сыворотке крови и моче у лиц с разной степенью некроза паренхимы поджелудочной железы показали, что активность фермента в биологических жидкостях не отражает степень воспаления железы и их измерение имеет малое значение для наблюдения за состоянием больного. Тем не менее чувствительность и специфичность определения α -амилазы при диагностике острого панкреатита возрастают при изменении границ нормальных значений (дискриминационный уровень нормы и патологии — активность, в 1,5–2 раза превышающая верхние границы нормы). В этом случае определение активности α -амилазы наиболее информативно в первые сутки развития острого панкреатита. По мнению ряда авторов, определение активности α -амилазы в сыворотке крови при хроническом панкреатите не имеет диагностического значения. Возможно, этот вывод сделан на основании неудовлетворительной точности и воспроизводимости методов определения активности α -амилазы при низких (часто субнормальных) значениях активности фермента, характерных для данного заболевания.

У человека α -амилазу, свободно проходящую через фильтрационный барьер почечных телец, реабсорбируют клетки эпителия почечных канальцев так же, как и другие низкомолекулярные белки сыворотки крови. Увеличение активности амилазы в сыворотке крови может быть вызвано нарушением элиминации фермента. Пример — состояние, называемое макроамилаземией, когда фермент связан с иммуноглобулинами сыворотки крови и образует макромолекулярный комплекс. Такой комплекс не фильтруется в мочу и не может быть удален при помощи каких-то иных механизмов, что ведет к значительно-

му и порой длительному увеличению активности α -амилазы в сыворотке крови. Макроамилаземия встречается у здоровых людей с частотой 1%, у лиц с гиперамилаземией — с частотой 2,5%. Макроамилаземия может быть диагностирована методом ультрацентрифугирования, ЭФ, гель-хроматографии, предложен также простой тест преципитации комплекса полиэтиленгликолем.

Активность α -амилазы в сыворотке крови часто увеличена при почечной недостаточности, однако не совсем ясно, что является причиной такого увеличения — возрастание образования фермента или снижение его элиминации. В таких случаях дополнительную информацию может дать определение скорости экскреции α -амилазы или расчет клиренса фермента.

По данным многих авторов, наиболее чувствительным и специфичным тестом для диагностики панкреатита служит уровень активности П-изофермента α -амилазы. Особое значение этот тест приобретает, если у больного с предполагаемым диагнозом панкреатита обнаружена нормальная общая активность амилазы. По сниженной активности П-амилазы может быть диагностирован хронический панкреатит. Доля П-изоамилаз в общей активности α -амилазы значительно выше в моче, чем в сыворотке крови, возможно, вследствие различий в экскреции изоферментов почками. Тем не менее диагностическое значение определения активности изоферментов α -амилазы в моче уступает таковому в крови.

Методы определения активности амилазы

Измерение активности α -амилазы для диагностических целей широко применяют в клинике на протяжении более 100 лет. За это время описано более 200 методов определения активности фермента. Несмотря на большое разнообразие предложенных методов, они могут быть объединены в 3 группы: амилокластические, глюкокластические и хромогенные.

Амилокластические методы. В амилокластических методах определения активности α -амилазы измеряют распад крахмального субстрата, используя турбодиметрический, йодометрический или нефелометрический принцип. Йодометрические

методы основаны на способности избытка негидролизованного субстрата давать в реакции с йодом окрашенные соединения. Интенсивность окраски зависит от состава субстрата: молекулы декстринов, имеющие более 30 гексозных остатков, дают красную окраску; молекулы, состоящие из 4–5 гексозных остатков, окрашенных продуктов в реакции с йодом не дают. Зависимость окраски от свойств и состава крахмального субстрата ставит вопрос о его унификации. Активность фермента определяют по убыли оптической плотности субстрата после гидролиза амилазой.

Хромогенные методы. Другая группа методов определения активности α -амилазы основана на использовании хромогенных нерастворимых субстратов. Хромогенный субстрат — полисахарид, который вследствие ковалентного связывания с красителем становится нерастворимым. Методы различаются как субстратом (крахмал, амилопектин, амилоза), так и связанным с ним красителем. α -Амилаза гидролизует субстрат с образованием растворимого хромогена. После остановки реакции непрореагировавший нерастворимый субстрат удаляют центрифугированием, и в супернатанте определяют оптическую плотность хромогена; для лучшей воспроизводимости желательно провести фильтрование супернатанта. Активность фермента рассчитывают по сравнению со стандартом (препаратом α -амилазы) или контрольной сывороткой с известной активностью фермента, учитывая спонтанный гидролиз хромогенного субстрата. Единицу активности α -амилазы в этой группе методов рассчитывают по коэффициенту экстинкции хромогена.

Глюкокластические методы. В последнее время получили распространение сахарогенные методы определения активности α -амилазы, основанные на ферментативном определении продукта реакции (глюкозы). Субстрат и ферменты, способствующие образованию глюкозы, различаются в коммерческих наборах разных фирм. Широкое применение получили методы с использованием УФ-спектроскопии. В этих методах образование сахаров сопряжено с восстановлением НАД и активность α -амилазы определяют по скорости увеличения абсорбции при длине волны 340 нм, обусловленной формированием НАДН. Ферментативные методы определения активности α -амилазы особенно удобны при

наличии автоматического автоанализатора, они позволяют использовать микроколичества (2–5 мкл) биологического материала, просты в исполнении. Однако они не лишены недостатков, обусловленных составом субстрата и комплексом сопряженных реакций; промежуточные продукты могут исказить конечный результат.

ПРОБЛЕМЫ, СВЯЗАННЫЕ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ

Несмотря на пристальное внимание, уделяемое изучению α -амилазы на протяжении многих лет, исследование активности фермента сопряжено с отдельными трудностями: отсутствием гомогенного субстрата с определенной химической структурой, образованием смеси продуктов реакции, множественными механизмами реакции. В настоящее время в клинической биохимии это единственный фермент, для которого не разработан не только референсный, но даже оптимальный метод определения активности, малодоступен стабильный материал для проведения внешнего контроля качества. Отсутствие унифицированного субстрата, разные механизмы реакции и образуемые продукты реакции — все это находит отражение во множестве способов выражения активности фермента (амилокластические единицы, хромогенные и др.), что затрудняет сопоставление данных, полученных разными методами.

Различие в механизме и продуктах реакции, способе выражения активности фермента ставит вопрос о сопоставимости данных, полученных разными методами. В ряде работ установлено, что результаты определения активности α -амилазы хорошо коррелировали друг с другом, однако значения активности фермента, определенные каждым из методов, были различными. В этой связи высказано сомнение в идентичности данных, полученных в реакциях с разными механизмами действия.

Среди обычно используемых методов разделения изоферментов α -амилазы следует отметить ЭФ на разных поддерживающих средах, хроматографию, изoeлектрическое фокусирование, определение активности с учетом специфичности по субстратам и ингибиторам каждого из изоферментов, иммунохимические методы.

α -Амилаза — стабильный фермент, активность которого не изменяется при хранении при 20 °С в течение недели и при 4 °С в течение месяца. Хранение проб сыворотки крови при -20 °С в течение 3 мес при неоднократных замораживаниях и оттаиваниях не изменяет спектр изоферментов. Изменения истинного распределения фракций амилазы могут происходить, если процедуру ЭФ проводят при 37 °С в течение нескольких часов. Нежелательна также длительная инкубация при 37 °С при определении низкой активности фермента.

Особые проблемы связаны с хранением проб мочи. Известно, что амилаза быстро инактивируется при рН ниже 5,0, поэтому рекомендовано собирать мочу в буфер при рН 7,0. Однако если моча находится в мочевом пузыре хотя бы некоторое время, фермент будет инактивирован кислой мочой. Сомнительно также, сможет ли фермент избежать распада в очень кислой моче, перед тем как покинет почки. Влияние мочи с низким рН на активность фермента необходимо учитывать при исследовании отношений клиренсов амилазы и креатинина, проводимом у больных с нарушенной функцией почек.

γ -Глутамилтранспептидаза

В последние годы в клинической химии подобающее место заняло определение активности γ -глутамилтрансферазы (ГГТ; γ -глутамилтранспептидазы, КФ 2.3.2.2).

ГГТ катализирует перенос γ -глутамила на аминокислоту или пептид, на другую молекулу субстрата или воду. ГГТ — белок, состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 90 кД. Фермент содержит гидрофильный и гидрофобный фрагменты. Активный центр расположен на гидрофильном участке полипептидной цепи. Гидрофобная область — часть цепи, которой фермент прикреплен к мембране. Если экстракцию фермента из тканей провести с использованием в качестве детергента желчных кислот или тритона X-100, ГГТ вместе с гидрофобным участком может быть переведена в раствор. Если в экстрагирующую смесь включены только протеазы (папаин или трипсин), гидрофобный фрагмент ГГТ остается на мембране, а в растворе оказывается гидрофильная часть полипептида ГГТ. Гидрофиль-

ные фрагменты ГГТ, изолированные из печени или почек, иммунологически сходны, так же как и гидрофобные фрагменты ГГТ, изолированные из разных органов.

ГГТ занимает важное место в метаболизме аминокислот. Комплекс биохимических реакций реабсорбции аминокислот из первичной мочи, профильтрованной через фильтрационный барьер почечных телец, назван глутаминовым циклом. Этот процесс начинается с действия ГГТ, которая расположена на наружной поверхности клеточной мембраны и связывает аминокислоту первичной мочи с клеткой эпителия канальцев при участии естественного субстрата глутатиона, образуя тройной комплекс: аминокислота–ГГТ–глутатион. Отмечено ингибирование реакции высокими концентрациями субстратов. Как следствие связывания 2 субстратов в активном центре фермента происходит перенос глутаминовой кислоты от глутатиона к аминокислоте. В этой фазе цикла аминокислоту переносят в клетку, где происходят последующие реакции, в которых глутаминовая циклотрансфераза расщепляет связь между аминок- и глутаминовой кислотой, потребляя молекулу АТФ. Присутствие ГГТ на мембране клеток других органов (тонкая кишка, хориоидальное сплетение и др.) дает основание предположить, что и в этих органах фермент принимает участие в транспорте аминокислот. Роль ГГТ печени полностью не выяснена; предположительно фермент связывает молекулы веществ, которые необходимо экскретировать.

Биологическая роль фермента связана также с регуляцией уровня глутатиона в тканях. Именно этим можно объяснить высокий уровень глутатиона в плазме крови и моче пациентов с генетически детерминированным отсутствием синтеза ГГТ. Регулируя уровень глутатиона, ГГТ может влиять на синтез белка, что объясняет повышенную удельную активность фермента в тканях с высокой скоростью метаболизма. Это же может быть причиной повышенного уровня фермента в тканях и крови новорожденных.

ГГТ содержится в основном в мембране клеток, обладающих высокой секреторной или адсорбционной способностью: эпителиальных клетках, выстилающих желчные пути, печеночных канальцах, проксимальных канальцах нефрона, панкреатической

экзокринной ткани и выводных протоках, ворсинчатых клетках тонкой кишки. В порядке снижения удельной активности ГГТ ткани располагаются в следующей последовательности: почки, печень, поджелудочная железа, щеточная кайма клеток тонкой кишки. У взрослых высокая удельная активность ГГТ присутствует только в гепатоцитах периферической зоны печеночных долек, богатых билиарными эпителиальными клетками, тогда как у новорожденных отмечена высокая удельная активность ГГТ во всей ткани печени. Активность ГГТ не обнаружена в скелетных мышцах и миокарде. Активность фермента в сыворотке крови здоровых лиц по сравнению с тканями невелика.

Синтез ГГТ в организме человека кодирует один локус гена, гетерогенность фермента связана с постсинтетическими изменениями и зависит от степени сialiлирования, гликозилирования и т. д. В сыворотке крови отмечено наличие форм ГГТ, имеющих одинаковую молекулярную массу и каталитические свойства, но отличающихся по электрофоретической подвижности. Диагностическое значение изоформ ГГТ при ряде патологических состояний до конца не изучено. Уточнению диагностического значения изоформ ГГТ при патологических состояниях и внедрению этого теста в лабораторную практику будет способствовать введение единой классификации различных молекулярных форм ГГТ.

Клиническое значение определения концентрации ГГТ в сыворотке крови

Наиболее частая причина повышения активности ГГТ в сыворотке крови — патология печени. Слабое токсическое воздействие на печень, вызывающее жировую инфильтрацию, прием алкоголя и лекарственных препаратов сопровождаются умеренным увеличением активности ГГТ. Более выраженное повышение активности фермента связано с внепеченочной и внутрипеченочной обструкцией, вторичным вовлечением печени в онкологические процессы организма путем метастазирования. Самая высокая активность ГГТ в сыворотке крови отмечена при закупорке желчного протока или злокачественных опухолях, прямо или опосредованно поражающих печень.

При отсутствии желтухи определение ГГТ — чувствительный тест для выявления патологии печени; клиническая чувствительность выше, чем у таких ферментов, как ЩФ и 5-нуклеотидаза. При онкологических заболеваниях нормальная активность ГГТ в сыворотке крови свидетельствует об отсутствии метастазов в печени, тогда как высокая активность ГГТ (в 12 раз и более выше нормы) служит индикатором поражения печени метастазами. При остром вирусном гепатите многократное исследование активности ГГТ позволяет следить за течением болезни: постоянно увеличенная активность ГГТ указывает на развитие хронической формы заболевания. При увеличении активности ЩФ и трудностях определения ее изоферментов полезно определять активность ГГТ для идентификации возможного источника гиперферментемии: активность ГГТ остается в пределах нормы, если увеличение активности ЩФ вызвано костным изоферментом, и увеличена, когда фермент образуется в печени. В педиатрии определение активности ГГТ предпочтительнее, чем определение ЩФ, особенно в условиях скрининга, так как активность ГГТ не меняется с возрастом и полученные результаты легче интерпретировать.

Высокая активность ГГТ присутствует в крови людей, злоупотребляющих алкоголем. У 74% алкоголиков, страдающих гистологически подтвержденным поражением печени, увеличение активности ГГТ было постоянным даже в периоды абстиненции. Существуют определенные различия между активностью ГГТ в крови алкоголика и человека, принявшего значительную дозу алкоголя. У первых наступает увеличение активности ГГТ до 140% от нормальных значений с пиком активности через 18 ч, у вторых даже после тяжелого опьянения увеличение активности ГГТ не превышает 15% в течение 12 ч.

Развитие инфаркта миокарда сопровождается изменениями активности ферментов сыворотки крови (КК, ЛДГ, АСТ). К ним может быть отнесена и ГГТ, активность которой после приступа стенокардии остается повышенной в течение длительного времени. Повышение активности ГГТ отмечено у 50% больных стенокардией и у части пациентов с другими заболеваниями (коронарная недостаточность, недостаточность кровообращения); изменения активности ГГТ не имеют значения в диагностике

инфаркта миокарда. При инфаркте миокарда остаются неясными механизмы увеличения активности ГГТ, поскольку она отсутствует в сердечной мышце.

Активность ГГТ в моче выше, чем в сыворотке крови. Присутствующая в моче ГГТ имеет почечное происхождение: фермент выделяется в мочу из разрушенных клеток проксимальных отделов канальцев, которые содержат ГГТ в высокой концентрации.

Методы определения активности ГГТ

В настоящее время при определении активности ГГТ в качестве акцептора глутаминовой группы используют глицинглицин: оптимальная концентрация его подавляет реакцию гидролиза, но не транспептидации. В качестве донора глутаминового радикала предложено использовать многие соединения: N-γ-глутамил-аминопропионитрил, γ-L-глутамил-β-нафтиламид, N-(DL-γ-глутамил)-анилин и L-γ-глутамил-p-нитроанилин (glu-PA). Широкое применение нашло последнее соединение, для выявления окрашивания которого не требуется дополнительных реакций. Кроме того, коэффициент молярной экстинкции p-нитроанилина ($E = 9,9 \text{ см/мкмоль}$ при длине волны 405 нм) достаточно высокий.

Активность ГГТ в сыворотке крови мужчин в полтора раза выше, чем у женщин, что можно связать с влиянием андрогенов. Отмечена положительная корреляция между активностью фермента и массой тела. В течение беременности активность ГГТ в крови снижается, особенно в первые недели. Плазма новорожденных содержит ГГТ в концентрации, в 8–10 раз превышающей таковую у взрослых; у недоношенных она даже выше. В течение 7–9 мес жизни активность ГГТ в крови уменьшается (20–50% активности взрослых), оставаясь постоянной до периода полового созревания.

КРЕАТИНКИНАЗА

Креатинкиназа — АТФ: креатин-N-фосфотрансфераза (КФ 2.7.3.2) — катализирует обратимый перенос фосфатного остатка между АТФ и креатином с образованием АДФ и кре-

атинфосфата. Общепринято сокращенное название фермента — креатинкиназа (КК). КК — цитозольный и митохондриальный фермент, который функционирует в клетках многих тканей. Продукт реакции фосфокреатин — макроэргическое соединение, обеспечивающее энергией сокращение мышцы, ее расслабление и транспорт метаболитов в миоцит. В первое время активность КК в крови интересовала клинических химиков как тест для выявления поражения поперечнополосатой мускулатуры. В настоящее время активность КК — ведущий тест в диагностике инфаркта миокарда.

Наибольшее содержание КК отмечено в миокарде и скелетных мышцах, высокое содержание — в языке, мышце диафрагмы, низкое — в почках, легких, печени. КК — димер; в цитозоле клеток тканей человека присутствуют 2 субъединицы: М — мышечный тип и В — мозговой тип. Субъединицы представляют собой белки с молекулярной массой 41 000 Д с активным центром в каждой субъединице. Соответственно 2 формам субъединиц димерная форма молекулы КК имеет следующие варианты: мышечный тип КК-ММ, гибридный димер КК-МВ, характерный для миокарда, и изофермент КК-ВВ, локализованный преимущественно в мозговой ткани (табл. 1.6).

Таблица 1.6. Общая активность КК и ее коферментные спектры в различных органах и тканях крыс

Органы и ткани	Активность КК, ЕД/г сухой массы	ММ, %	ВВ, %	МВ, %
Скелетная мускулатура	15 000	100	0	0
Сердце	2000	75	1	24
Мозг	1000	2	98	0
Селезенка	180	6	90	4
Легкие	150	17	77	6
Почки	100	11	89	0
Печень	60	92	8	0

Активность фермента и распределение его изоферментов органоспецифичны, поэтому идентификация и количественное

определение изоферментов КК в сыворотке крови не только полезно для установления увеличения проницаемости мембран или повреждения специфического органа, но и дает возможность установления диагноза, наблюдения клинического течения и оценки прогноза заболевания. В электрическом поле наибольшей подвижностью обладает КК-ВВ, наименьшей — КК-ММ, гибридная форма КК-МВ занимает промежуточное положение. В соответствии с этим в классификации Международного союза теоретической и прикладной химии КК-ВВ обозначена изоферментом I КК, КК-МВ — II, КК-ММ — III. Для понимания источников появления в крови активности КК-МВ следует отметить, что у плода до 16-недельного возраста в мышечной ткани доминирует зародышевая форма КК, а именно КК-МВ, которая позже замещается КК-ММ. Определенная перестройка изоферментного состава КК происходит и при гипертрофии миокарда: повышается процентное содержание КК-МВ и КК-ВВ, а доля КК-ММ оказывается сниженной. Миоциты в условиях длительной гиперфункции повышают синтез изоформы КК-ВВ.

Клиническое значение определения активности КК и ее изоферментов

Повышение активности КК в крови может быть следствием травмы, переохлаждения или перегревания, голодания и бактериальной интоксикации, дегидратации, поражения электрическим током. Повышенная активность КК-МВ отмечена при мышечной дистрофии разной этиологии, ишемическом рабдомиолизе с миоглобинурией, отравлении угарным газом. Активность КК-МВ повышалась, более чем на порядок превышая норму, у больных острым перикардитом при инверсии сегмента *S-T*.

Опыт применения изоферментной диагностики в блоке интенсивной терапии показал, что повышение в крови активности КК-МВ может происходить при выраженной недостаточности кровообращения, катетеризации сердца, отеке легких, аритмиях, кардиогенном шоке, алкогольной интоксикации, кровотечении из ЖКТ, травматической эпилепсии, травме грудной клетки. Активность КК-МВ повышена в крови пациентов при синдроме шока, развившемся при анемии, гиперкапнии, гипоксемии,

молочнокислом ацидозе, выраженной гипотонии. Однако только в редких случаях в указанных ситуациях активность КК-МВ на 6% превышала активность КК. Учитывая возможности неспецифического повышения активности КК-МВ, надо помнить и о возможности пропустить небольшой инфаркт миокарда. У больных с гипертрофией миокарда активность КК-МВ в период инфаркта может достигать $1/3$ активности КК.

Повышение активности КК в сыворотке крови может быть обусловлено увеличением активности изофермента КК-ММ. Активность КК-ММ в сыворотке крови повышается при прогрессирующей мышечной дистрофии, дерматомиозите, полимиозите, инфаркте миокарда, гипотиреозе, некоторых заболеваниях нервной системы. Активность КК-ММ увеличивается также после физической нагрузки, внутримышечных инъекций, хирургических операций. При мышечной дистрофии типа Дюшенна (наследственном, связанным с полом рецессивном заболевании) активность КК-ММ увеличивается в 8–90 раз по сравнению с нормой, активность изофермента увеличена также у носителей этого гена.

Активность КК-ВВ в крови отмечали во время аортокоронарного шунтирования. Полагают, что активность КК-ВВ может быть тестом аноксии тканей. Активность КК-ВВ в крови может также быть следствием гипоксического повреждения мозга, особенно в условиях перинатальной гипоксии. Активность КК-ВВ увеличена у 53% новорожденных с асфиксией. КК-ВВ присутствует в гладкой мускулатуре, но не определяется в сыворотке крови лиц с доброкачественными заболеваниями этих тканей. Одним из возможных объяснений повышения активности КК-ВВ в крови при сосудистых операциях служит предположение, что стенки вен, как, впрочем, и аорты, содержат только одну форму КК, а именно КК-ВВ.

Активность изофермента КК-ВВ может быть повышена в крови при раке предстательной железы, мелкоклеточном раке легкого, аденокарциноме желудка, лейкозах, хронической почечной недостаточности, передозировке миорелаксантов. Метастазирование рака предстательной железы сопровождается особенно высокими цифрами активности КК-ВВ в крови. Исследователи сходятся во мнении, что активность КК-ВВ может быть исполь-

зована как неспецифический маркер опухолевого процесса. Следует отметить, что при опухолевом процессе активность КК-ВВ в крови присутствует в форме макро-КК-I.

В ряде случаев при инфаркте миокарда, а иногда и в его отсутствие высокая активность КК сохраняется неопределенно долго. Наблюдаемые явления обусловлены циркуляцией в крови необычных форм КК и ее изоферментов. После разделения при ЭФ фракций КК на электрофореграмме становятся видимыми полосы, не соответствующие положению полос КК-ММ, КК-МВ и КК-ВВ, и можно отметить наличие изоформ КК, движущихся к катоду, что из белков сыворотки крови свойственно иммуноглобулинам. Известно, что окисление сульфгидрильных групп КК изменяет электрофоретическую подвижность молекул, однако при этом они по-прежнему движутся к аноду. У больных метастазирующим раком предстательной железы выделен изофермент КК, мигрирующий между КК-МВ и КК-ВВ.

Методы определения активности КК

Фермент КК катализирует обратимое фосфорилирование креатина и АДФ согласно реакции:



Аналитические методы, используемые в клинической биохимии для определения активности КК, могут быть основаны как на прямой, так и на обратной реакции. В ходе реакции можно определить количество креатина или концентрацию креатинфосфата. Первыми методами определения активности КК были методы конечной точки; в настоящее время доминируют кинетические методы.

Креатинфосфат в кислой среде гидролизуетсся с большей скоростью, чем АДФ и АМФ, при этом образуются креатин и ортофосфат. Далее количество освобожденного при гидролизе ортофосфата определяют по формированию молибденового синего в реакции Фiske–Суббароу (прямой метод). В других реакциях освобожденный при гидролизе креатин взаимодействует с нингидрином, диацетилом или α -нафтолом с формированием флюорофоров. Флюоресценцию последних измеряют при специ-

фических длинах волн испускания на флюоресцентном спектрофотометре.

В настоящее время для определения активности КК используют метод, предложенный Оливер и соавт., который основан на обратной реакции — кинетическом определении образующегося в реакции креатинфосфата. Кинетическая УФ-спектроскопия — референсный метод определения активности КК в соответствии с методом Оливер и соавт.

Увеличение абсорбции реакционной смеси при длине волны 340 нм и кинетическом измерении позволяет определить активность КК в большом интервале активности. Дальнейшее совершенствование метода касается введения в реакцию АМФ для ингибирования аденилаткиназы и добавления N-ацетилцистеина с целью защиты тиоловых групп фермента от окисления.

Методы исследования изоферментов КК обычно делят на 5 категорий: ЭФ на разных поддерживающих средах, ионообменная хроматография, иммуноингибирование, иммунопреципитация, радиоиммунные методы.

Электрофоретические методы идентификации изоферментов КК надежны, хотя требуют много времени; их относят к полуколичественным. Чувствительность колориметрического метода идентификации изоферментов после ЭФ-разделения очень низкая, поэтому для получения точных результатов рекомендуют применение флюоресцентного метода, хотя линейный диапазон его относительно узок. Диффузия флюоресцентных полос меньше в ацетате целлюлозы, чем в агарозе, однако разделение изоферментов происходит лучше в агарозе.

Активность КК определяют в сыворотке и плазме крови (в качестве антикоагулянта можно применять только гепарин), в спинномозговой и амниотической жидкости.

В крови здоровых людей активность КК составляет 20–75 МЕ/л у женщин и 20–150 МЕ/л у мужчин. Более высокая граница нормы для мужчин связана с большей массой мышечной ткани; увеличение массы тела при ожирении не сопровождается повышением активности КК. Дискриминационный уровень, выше которого активность КК может свидетельствовать о наличии инфаркта миокарда, составляет 200 МЕ/л, хотя и не исключено наличие субэндокардиального инфаркта при

активности КК 160–180 МЕ/л. Современные методические приемы позволяют получать линейные результаты активности КК от 3 до 1000 МЕ/л. Принято считать, что активность КК-МВ, на 6% превышающая активность КК, свидетельствует о наличии инфаркта миокарда, меньшая доля изофермента КК-МВ — о поражении скелетных мышц. Эта величина условна и связана с диагностикой инфаркта миокарда.

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ; L-лактат-НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27) — цинксодержащий фермент, обратимо катализирующий окисление лактата в пируват. ЛДГ — тетрамер; 2 локуса генов кодируют синтез 2 олигомеров — М- и Н-субъединиц. М-субъединица синтезируется главным образом в тканях с анаэробным метаболизмом, в то время как Н-субъединица присутствует в тканях с преобладанием аэробных процессов. Молекулярная масса каждой субъединицы составляет 35 кД, каждого тетрамера — 140 кД. Полипептидная цепь обеих субъединиц содержит 330 аминокислотных остатков; различия в их последовательности в субъединицах обнаружены на протяжении более чем 25% длины полипептидной цепи. В тетрамерной структуре ЛДГ субъединицы связаны силами ионных и водородных взаимодействий. На каждой субъединице расположен каталитический центр; диссоциация тетрамера на димеры или мономеры приводит к потере ферментативной активности.

В цитоплазме клеток и сыворотке крови ЛДГ имеет 5 изоферментов, обозначаемых в соответствии с их подвижностью к аноду в электрическом поле: ЛДГ₁ (НННН), ЛДГ₂ (НННМ), ЛДГ₃ (ННММ), ЛДГ₄ (НМММ) и ЛДГ₅ (ММММ). ЛДГ₁ участвует в окислении лактата в пируват в тканях с аэробным типом метаболизма (миокард, мозг, почки, эритроциты, тромбоциты). ЛДГ₅ оптимизирована природой для превращения пирувата в лактат в тканях с высоким уровнем гликолиза (скелетные мышцы, печень). Не все изоферменты ЛДГ гомогенны: при электрофоретическом разделении изоферментов ЛДГ сыворотки и эритроцитов в полиакриламидном геле обнаружено расщепление ЛДГ₃ на 2 полосы, которое позволяет предположить синтез 2 форм

ЛДГ₃ в тканях. Наличие молекулярных структур 2 форм, подтвержденное в реакции с антисывороткой, объясняют различием пространственного (цис и транс) расположения Н-субъединиц и М-субъединиц в тетрамере.

В тканях человека активность ЛДГ на 1 г сухой массы уменьшается в последовательности: почки—скелетная мышца—поджелудочная железа—селезенка—печень—плацента. ЛДГ присутствует в эритроцитах, тромбоцитах и лейкоцитах. Изоферменты ЛДГ₁ и ЛДГ₂ преобладают в эритроцитах, лейкоцитах, миокарде, почках, ЛДГ₄ и ЛДГ₅ — в печени, скелетных мышцах, неопластических тканях, наиболее высокое содержание ЛДГ₃ отмечают в лимфоидной ткани, тромбоцитах и опухолях.

Свойства изоферментов ЛДГ определены особенностями входящих в них субъединиц. Изоферментам ЛДГ присущи разные кинетические характеристики: рН, при котором они проявляют максимальную активность, сродство к субстратам и кофакторам. Так, например, у ЛДГ₅ (М₄) константа Михаэлиса выше, чем у ЛДГ₃, а максимальная скорость реакции ЛДГ₃ меньше, чем у других изоферментов. Изофермент ЛДГ₁ чувствителен к ингибированию высокими концентрациями пирувата, тогда как на активность ЛДГ₅ не оказывает влияние изменение концентрации субстрата, по крайней мере в физиологических пределах. Иммунологическое исследование показало, что субъединицы ЛДГ не имеют общих антигенных детерминант.

Клиническое значение определения активности ЛДГ

Активность ЛДГ в сыворотке крови повышается при многих патологических состояниях, поэтому для дифференциальной диагностики заболеваний более целесообразно исследовать изменения спектра изоферментов ЛДГ. В настоящее время накоплено большое количество данных о распределении изоферментов ЛДГ в тканях и об изменении спектра изоферментов ЛДГ в сыворотке крови при различных заболеваниях. Изоферментный спектр скелетной мускулатуры показывает преобладание ЛДГ₅. При мышечной дистрофии отмечены увеличение более подвижных изоферментов ЛДГ и снижение активности ЛДГ₅, что характерно и для многих нейромышечных заболеваний. Причиной

изменения спектра изоферментов может быть быстрое удаление малоподвижных изоферментов из циркуляции. Активность ЛДГ₅ в сыворотке крови — чувствительный индикатор гепатоцеллюлярного поражения, увеличение его активности обычно наблюдают при гепатите, гипоксии печени (включая застой крови в печени вследствие сердечной недостаточности), лекарственной интоксикации, циррозе, опухолях и травме. Активность ЛДГ сыворотки крови всегда повышена при мегалобластной и гемолитической анемии, увеличение это связано с ростом активности ЛДГ₁ и ЛДГ₂. Распределение изоферментов почти всегда соответствует норме при железодефицитных анемиях, панцитопении и вторичных полицитемиях. Активность ЛДГ в сыворотке крови не повышается при хронических заболеваниях почек и уремии, но иногда возрастает после гемодиализа или плазмафереза, что может быть объяснено удалением из крови ингибиторов (мочевина, оксалаты).

Общая активность ЛДГ при инфаркте миокарда наиболее значительно повышается в течение первых 2 сут после приступа стенокардии и до исходного уровня понижается медленно, в течение 14–16 дней, эпизодическое повышение ЛДГ можно отметить и в более поздние сроки. В остром периоде инфаркта миокарда активность ЛДГ в сыворотке крови может возрастать до 10–20 МЕ/л. В диагностике инфаркта миокарда единичное определение общей активности ЛДГ имеет невысокую клиническую специфичность — не выше 60%, однако динамическое исследование фермента на протяжении 24–48 ч повышает специфичность теста до 72–84%. Все 5 изоферментов присутствуют в экстракте кардиомиоцитов, содержание ЛДГ₁ в изоферментном спектре миокарда составляет 55–65%. Выброс миокардиальных изоферментов ЛДГ в сыворотку крови ведет к увеличению активности ЛДГ₁ и ЛДГ₂, при этом активность ЛДГ₁ будет выше. Достоверное повышение в сыворотке крови активности ЛДГ₁ можно отметить и раньше того момента, когда активность ЛДГ₁ станет выше таковой ЛДГ₂, что дает основание использовать активность ЛДГ₁ для более ранней диагностики инфаркта миокарда. Активность ЛДГ₁ увеличивается через 12–24 ч после возникновения инфаркта миокарда, совпадая во времени с максимумом активности

КК-МВ и опережая возникновение пика общей активности ЛДГ (24 ч).

Активность ЛДГ подвержена гормональному влиянию. Большие дозы тироксина снижали синтез фермента, при этом в большей мере отмечено ингибирование синтеза субъединицы М. Норадреналин и адреналин вызывают увеличение общей активности ЛДГ с преобладанием активности ЛДГ₁ и ЛДГ₂. Активность фермента в крови возрастает при действии анаболических стероидов и этанола, а также ряда медикаментозных препаратов — клофибрата, кофеина, сульфаниламидов и др.

Спектр изоферментов ЛДГ может меняться при неопластических процессах. В таких случаях его трудно интерпретировать, так как источником изоферментов ЛДГ служит не только неопластическая ткань, но и ткани, разрушаемые метастазами. Однако изоферментный спектр транссудатов при опухолевом поражении сходен с таковым сыворотки крови, тогда как в воспалительных экссудатах преобладает активность ЛДГ₁ и ЛДГ₂. Для ЛДГ, как и для других ферментов, при опухолевом процессе характерен синтез изоферментов, свойственных эмбриональным тканям. Недифференцированные эмбриональные ткани имеют спектр изоферментов ЛДГ, в котором преобладают ЛДГ₂ и ЛДГ₃, а также ЛДГ₄. В злокачественных опухолях обнаружено 3 вида распределения изоферментов ЛДГ. Увеличение содержания ЛДГ₄ и ЛДГ₅ выявлено при опухолях предстательной железы, матки, молочных желез, желудка, толстой кишки, мочевого пузыря и некоторых типах опухолей мозга. У больных лейкозом, злокачественной лимфомой, нейробластомой, феохромоцитомой, а также при опухолях полости рта, раке бронхов и некоторых типах опухолей мозга увеличена активность ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄. Увеличение активности ЛДГ₁ отмечено в сыворотке крови больных с некоторыми типами опухолей мозга и разными типами опухолей половых органов. Активность ЛДГ₁ в сыворотке крови считают хорошим маркером тестикулярных опухолей, позволяющим установить дифференциальный диагноз между злокачественным и доброкачественным поражением ткани. Возможность повышения активности ЛДГ₁ при опухолевом процессе следует учитывать при диагностике инфаркта миокарда. Иногда при опухолях мозга, раке пищевода, нейробластоме отмечают необыч-

ную дополнительную полосу при ЭФ сыворотки крови и ткани опухоли. Определение спектра изоферментов ЛДГ в сыворотке крови при онкологических заболеваниях полезно не только для диагностики, но и для контроля эффективности лечения. Обнаружено, что нормализация спектра изоферментов ЛДГ коррелирует с успешностью ответа больного на лечение.

Наличие осложнений при инфаркте миокарда и сопутствующие заболевания могут изменить спектр ЛДГ и активность ЛДГ₁. Выявление спектра изоферментов, характерного для инфаркта миокарда, возможно при застое крови в печени и почках вследствие сердечной недостаточности, при ишемическом поражении некоторых органов из-за резкого снижения сердечного выброса. При эмболии легочной артерии, которую в ряде случаев приходится дифференцировать с инфарктом миокарда, увеличение в крови активности ЛДГ₂ и ЛДГ₃ может быть объяснено выходом ферментов из тромбоцитов, патологией печени, вызванной венозной гипертензией, анемией коркового слоя надпочечников и почек. Поскольку эти нарушения не всегда удается различить, изменение спектра изоферментов ЛДГ интерпретировать непросто.

В сыворотке крови тяжелобольных (как правило, в терминальном состоянии) методом ЭФ на ацетате целлюлозы выявляется дополнительная полоса, более близкая к катоду, чем ЛДГ₅, названная ЛДГ₆. Во всех наблюдениях в тканях печени, скелетных мышцах, почке, селезенке и надпочечниках также отмечено присутствие ЛДГ₆; в ряде случаев появление этой фракции носило транзиторный характер, ЛДГ₆ не обнаружена в тканях миокарда. Считают, что нет нозологической формы заболевания, для которой характерна ЛДГ₆, но есть тяжелые клинические состояния, обуславливающие ее появление, к которым следует отнести выраженный ацидоз, гипотонию и сепсис.

Описаны случаи низкой активности ЛДГ в сыворотке крови. В крови здоровых лиц обнаружен термозависимый ингибитор, присутствие которого снижает активность ЛДГ. Выявлено 42 случая низкой активности ЛДГ при исследовании 20 000 образцов сыворотки крови. В качестве ингибитора активности фермента в крови с разной частотой выступают IgG, IgA и IgM. Макро-ЛДГ с низкой активностью фермента отмечена у женщин

с лекарственной интоксикацией. После обработки иммунных комплексов меркаптоэтанолом иммуноглобулин оставался связанным с ЛДГ, но его ингибирующее влияние было подавлено; при добавлении меркаптоэтанола в сыворотку крови активность ЛДГ возрастала в 2 раза. Механизмы формирования иммунных комплексов с ЛДГ остаются неясными. Описаны случаи образования АТ к ЛДГ при приеме сульфаниламидных препаратов; после отмены препаратов АТ исчезали. Низкая активность ЛДГ в сыворотке крови может быть объяснена не только ингибированием, но и уменьшением времени пребывания в крови, быстрой элиминацией иммунных комплексов из циркуляции.

Вторичная причина низкой активности ЛДГ в сыворотке крови и тканях связана с генетическими нарушениями. Описаны особые варианты Н-субъединиц у американских индейцев, ферментативно неактивные, поскольку в составе тетрамера присутствовала только одна активная субъединица. Полное отсутствие Н- или М-субъединиц отмечено в японской популяции. Распространенность гетерозигот с дефицитом субъединиц ЛДГ составляет 0,15–0,2%. Клинически гомозиготы с дефицитом М-субъединиц имеют периодическую миоглобинурию после напряженной физической нагрузки, поражения кожи; роды у них протекают тяжело.

Методы определения активности ЛДГ

Основной метод определения активности ЛДГ — измерение оптической плотности НАДН при длине волны 340 нм. Выбор для практических целей реакции превращения пирувата в лактат объясняется тем, что вследствие высокого сродства ЛДГ к пирувату максимальная скорость этой реакции в 3 раза выше, чем образование пирувата из лактата. В случае прямой реакции аналитические трудности связаны с подбором оптимальной концентрации пирувата, поскольку его высокая концентрация в инкубационной среде ингибирует активность Н-субъединицы. Добавление к раствору пирувата ионов натрия и хлора позволяет снизить ингибирование ЛДГ субстратом.

Период преинкубации сыворотки крови с субстратной смесью до добавления стартового реагента (пирувата) необходим для за-

вершения реакций, катализируемых другими НАДН-зависимыми дегидрогеназами, присутствующими в сыворотке крови. Структурные аналоги лактата (α -оксибутират, α -оксикапронат) и пирувата (α -кетобутират, гликоксилат) также могут служить субстратом для ЛДГ.

Для определения относительного содержания изоферментов ЛДГ используют ряд физико-химических методов. К ним относят ЭФ, ионообменную хроматографию, иммунохимические методы, а также методы, в которых используют различия кинетических параметров отдельных изоферментов и дифференцированную чувствительность их к субстратам и ингибиторам. Метод ЭФ изоферментов ЛДГ относят к референсным.

Активность ЛДГ присутствует в крови здорового человека независимо от его пола и возраста. Общая активность ЛДГ в сыворотке крови здоровых лиц, определенная при 25 °С, составляет 100–225 МЕ/л. Методом ЭФ на любой поддерживающей среде в сыворотке крови здоровых лиц удастся разделить все 5 изоферментов ЛДГ, которые в процентном отношении распределены следующим образом: ЛДГ₁ — 14–26, ЛДГ₂ — 29–39, ЛДГ₃ — 20–26, ЛДГ₄ — 8–16, ЛДГ₅ — 6–16. Получены и несколько иные варианты распределения изоферментов ЛДГ в сыворотке крови здоровых лиц, однако во всех наблюдениях процентное содержание ЛДГ₂ в сыворотке крови было выше, чем ЛДГ₁. При некоторых методах ЭФ фракция ЛДГ₅ может быть и не выявлена, доля ее составляет 0–6%.

Стабильность активности ЛДГ зависит от температуры хранения и состава среды. Общая активность ЛДГ понижается на 10% через сутки хранения при 4 °С. При хранении разные образцы сыворотки значительно различаются по степени изменения общей активности ЛДГ и соотношению ее изоферментов. Имеются данные, что хранение проб замороженными приводит к значительным изменениям в распределении изоферментов — уменьшению доли слабодвижных изоферментов и увеличению быстрых фракций, что может быть причиной ложного увеличения отношения ЛДГ₁/ЛДГ₂. ЛДГ₁ и ЛДГ₂ сохраняли активность неизменной в течение 10 дней при хранении как при 4 °С, так и при –20 °С или 20 °С. Активность ЛДГ₄ понижается на 50% через 48 ч хранения при 4 °С. В этих же условиях

активность ЛДГ₅ оказалась пониженной на 72%. Последующее нагревание сывороток и крови, хранящихся в холодильнике, до 37 °С не возвращает активность ЛДГ к исходному уровню. Для предотвращения ошибок рекомендуют определять активность ЛДГ и соотношение ее фракций в день взятия крови, а если такой возможности нет, хранить сыворотку в течение 24 ч при комнатной температуре.

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА

Щелочная фосфатаза (ЩФ) — фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (КФ 3.1.3.1) — гидролизует разные синтетические субстраты при оптимуме рН, равном 10,0; субстрат фермента *in vivo* точно не известен. ЩФ — гликопротеин; по структуре это димер с кажущейся значительной вариацией молекулярной массы фермента в разных тканях. ЩФ — металлофермент, в состав активного центра фермента входит атом цинка. Полагают, что атом цинка повышает активность фермента, обеспечивая конформационные изменения и гидролиз моноэфиров ортофосфорной кислоты. Каждый мономер ЩФ содержит три металлосвязывающих центра. Лишенный ионов цинка фермент теряет активность, но восстанавливает ее после добавления металла. Активность фермента возрастает в присутствии ионов магния, для оптимальной активности необходимо определенное соотношение ионов магния и цинка.

ЩФ присутствует во всех органах человека; наиболее высокая удельная активность фермента обнаружена в эпителии тонкой кишки, эпителии канальцев почек, остеобластах, гепатоцитах и плаценте. Фермент плотно связан с клеточной мембраной гидрофобным карбоксильным концом полипептидной цепи; гидрофобный конец цепи идентичен у всех изоферментов ЩФ. ЩФ прикреплена к плазматической мембране с помощью фосфатидилинозитолгликанового якоря. Молекулы ЩФ на поверхности плазматической мембраны располагаются неравномерно. Возможно, что такая топография фермента связана с его невыясненной физиологической ролью.

Молекулярная масса ЩФ составляет 130–220 кД. Ассоциация ЩФ с гликозаминогликанами (нейраминовой кислотой)

может изменить не только молекулярную массу фермента, но и заряд молекулы и ее подвижность в электрическом поле. Степень гликозилирования ЩФ в тканях может влиять на ее термоллабильность.

Гетерогенность ЩФ выявлена уже при первом выделении фермента и подтверждена позднее при использовании разных субстратов, ингибиторов, а также методами иммунохимии, при использовании поли- и моноклональных АТ. Гетерогенность ЩФ имеет генетическую природу (изоферменты), а также может быть вызвана посттрансляционными изменениями белка (фосфорилированием, ацетилированием и гликозилированием).

В организме человека биосинтез фермента кодируют 3 гена: один — печеночный, костный и почечный изоферменты, другой — кишечный изофермент и третий — плацентарную ЩФ. Полагают, что существует и 4-й ген, кодирующий синтез зародышевой ЩФ. Последняя локализована в тонкой кишке плода примерно до 30 нед беременности. Эмбриональные и зрелые формы ЩФ сходны по каталитической активности. Выделение ЩФ из ткани печени с помощью фосфатидилинозитолспецифической фосфолипазы приводит к образованию форм, сходных с присутствующими в сыворотке крови. Эти данные позволяют считать, что формы ЩФ сыворотки крови образуются путем ферментативного гидролиза тканевых форм.

Клиническое значение определения активности ЩФ

Повышение активности ЩФ в сыворотке крови не всегда позволяет с достаточной степенью достоверности составить представление об органотопической патологии. Более детальную информацию позволяет получить исследование изоферментов ЩФ.

Анализ изоферментов ЩФ в настоящее время — прерогатива специализированных лабораторий. Изоферменты ЩФ имеют разную чувствительность к термической инактивации, при температуре 56 °С в течение 15 мин изоферменты ЩФ инактивируются в следующей последовательности: изофермент костной ткани — кишечный — плацентарный. При температуре 65 °С термостабильностью обладает только плацентарный изофермент ЩФ. При химической инактивации мочевиной костный изофермент также

оказывается чувствительным; наиболее резистентны плацентарный и кишечный изоферменты, ЩФ печени занимает промежуточное положение.

В клинической биохимии активность ЩФ наиболее часто используют в диагностике патологии гепатобилиарной системы и костной ткани. Активность ЩФ сыворотки крови часто повышена при обструктивных заболеваниях печени, холестазах, гепатите, явлениях гепатотоксичности, болезни Педжета, остеомалации, новообразованиях, вовлекших в патологический процесс печень и костную ткань.

Низкая или даже неопределяемая активность ЩФ отмечена при гепатолентикулярной дегенерации. Механизм этого феномена неясен, предполагают, что ион меди конкурирует с цинком за место в активном центре ЩФ, что ведет к резкому падению активности фермента. Применение гиполипидемических препаратов, в частности клофибрата, также ингибирует фермент.

ЩФ — маркер остеобластов, хотя ее физиологическая роль в этом виде клеток окончательно не выяснена. ЩФ присутствует на внешней стороне плазматической мембраны остеобластов и, как эктоэнзим, может осуществлять гидролиз фосфатов на поверхности клетки. Возможно, физиологическая роль ЩФ сводится к участию в кальцификации тканей, минерализации костной ткани, хотя конкретные пути ее влияния не установлены. Активность ЩФ в ткани увеличивается от неорганизованного хряща через пролиферирующий хрящ к примитивной губчатой костной структуре. Во время активного остеогенеза ЩФ попадает в кровяное русло, отражая процесс формирования костной ткани. У недоношенных детей с целью ранней диагностики рахита рекомендовано определять активность ЩФ.

Исследование активности ЩФ у больных с синдромом гипофосфатазии указывает на важную роль ЩФ в процессах минерализации костной ткани. Синдром гипофосфатазии — врожденное заболевание костной ткани, характеризующееся избирательной недостаточностью синтеза ЩФ. У пациентов с подобной патологией в тканях и сыворотке крови значительно снижена активность печеночного, костного и почечного изоферментов ЩФ при нормальной активности плацентарного и кишечного изоферментов. Другая особенность заболевания — накопление в крови

и моче фосфорсодержащих комплексов, служащих эндогенным субстратом ЩФ. К ним относят фосфоэтаноламин, пирофосфат, П-5-Ф и т. д. Заболевание вызвано точечными мутациями гена, кодирующего синтез фермента.

Во много раз более высокая активность ЩФ в крови новорожденных и в детском возрасте по сравнению со взрослыми указывает на важную роль ЩФ в процессах остеосинтеза, точнее, кальцификации — образования кристаллов фосфоапатита. Возможно, ЩФ принимает активное участие и в становлении патологических процессов, сопровождающихся кальцификацией в органах, непохожих на костную ткань (участки петрификации в органах, кальцификация атероматозных бляшек, трансплантатов). Не исключено, что в условиях низкой активности ЩФ высокая концентрация фосфорсодержащих компонентов в среде препятствует кристаллообразованию, что, однако, требует специального исследования.

Повышение активности ЩФ происходит не только в условиях активного роста костной ткани, но и при ее разрушении — остеопорозе и последующей остеомалации. При тяжелом остеопорозе и остеомалации активность ЩФ в сыворотке крови может быть нормальной или слабо повышенной (в 2–3 раза). Остеомалация, верифицированная гистологически, может протекать при нормальной активности ЩФ.

Активность ЩФ в сыворотке крови может быть повышена при остеомиодистрофии, развивающейся как осложнение длительного гемодиализа. При введении циклоспорина после трансплантации повышенная активность ЩФ в большей мере зависит от токсического влияния препарата на гепатоциты и в меньшей мере связана с патологией остеобластов. У пациентов с гиперпаратиреозом активность ЩФ сыворотки крови обычно в пределах нормы, но при развитии остеопороза, особенно остеонекроза, может быть значительно увеличена.

У пациентов с болезнью Педжета отмечена достоверная корреляция активности ЩФ и степени поражения скелета. При остеопорозе показана прямая зависимость активности ЩФ крови и экскреции с мочой оксипролина. В этих условиях активность ЩФ сыворотки крови можно применить для оценки эффективности терапии кальцитонином и фосфатами.

В печени ЩФ локализована в клетках эндотелия вокруг портальной и центральной вен как в синусоидах, так и в желчных канальцах. Многие фармакологические препараты вызывают холестаза, сопровождающийся увеличением активности ЩФ в крови в 2–10 раз, однако не следует исключать возможность токсического влияния лекарств и на остеобласты. Обобщая возможные механизмы гиперферментемии ЩФ при холестазе, следует отметить активацию желчными кислотами синтеза фермента *de novo*, экстракцию фермента с плазматической мембраны желчными кислотами, поступление свободного или мембранно-связанного фермента в циркуляцию. Исследование активности ЩФ оказывается полезным и в дифференциальной диагностике внутри- и внепеченочного холестаза. В случае экстрагепатобилиарной обструкции при камнях желчного протока и желчного пузыря, а также при новообразованиях в этих органах активность ЩФ повышается в 10 раз и более. Внутрипеченочная обструкция желчных путей при гепатите также сопровождается повышением активности ЩФ, но степень гиперферментемии не превышает 2–3-кратного значения. Острые некротические изменения гепатоцитов могут не сопровождаться повышением активности ЩФ до тех пор, пока в патологический процесс не будут вовлечены желчные канальцы и не произойдет задержка желчеотделения. В то же время далеко не во всех случаях поражения паренхимы печени существует четкая корреляционная зависимость между активностью ЩФ сыворотки крови и содержанием в ней билирубина. В начале развития внутрипеченочного стаза увеличение активности ЩФ может быть следствием повышения синтеза белка в гепатоцитах; последующее повышение активности ЩФ в сыворотке крови, особенно в форме макро-ЩФ, связано с нарушением целостности клеток желчных канальцев.

ЩФ с высокой молекулярной массой, присутствующая в сыворотке крови больных с внутри- и внепеченочным холестазом, — комплекс фермента с фрагментами плазматической мембраны гепатоцитов синусоидальной зоны печени. В разное время ЩФ с высокой молекулярной массой называли желчной, высокомолекулярной, каналикулярной, быстрой. Методом электронной микроскопии установлено, что ЩФ в крови больных с холестазом состоит из везикул трехслойной структуры, характерных для

плазматической мембраны гепатоцитов. Помимо ЩФ, эти фрагменты плазматической мембраны содержат и другие мембранно-связанные ферменты — γ -глутамилтранспептидазу, лейцинаминопептидазу, 5-нуклеотидазу. Специфичный для холестаза ЛП, названный ЛП-Х, имеет не большее диагностическое значение, чем ЩФ или ГГТ. Возможно, что ассоциация ЩФ с ЛП-Х дала основание назвать его холестатическим комплексом, хотя более верно для ЩФ с высокой молекулярной массой оставить термин «мембранно-связанный комплекс ЩФ». При идентификации методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определение высокомолекулярного изофермента ЩФ — лучший тест и более чувствительный индикатор ранних сроков холестаза (по сравнению со всеми другими тестами).

С момента сообщения о возможности эктопической продукции ЩФ опухолевой тканью описаны 3 изофермента: изофермент Регана (плацентарная ЩФ), изофермент Нагао (тестикулярная, плацентарноподобная ЩФ), изофермент Касахара (зародышевая кишечная ЩФ). Возможность исследования их возникла только при использовании техники гибридом и получении моноклональных АТ. Все 3 изофермента — потенциальные маркеры опухолевого процесса. Несмотря на наличие более специфичных изоферментов, общую активность ЩФ также рассматривают как полезный индикатор рака молочной железы с метастазами в кости. В оценке выживаемости больных раком предстательной железы увеличение общей активности ЩФ рассматривают как прогностически неблагоприятный фактор.

Нейтрофильные гранулоциты также содержат ЩФ, но природа этой изоформы остается неясной. Разные формы ЩФ описаны в нейтрофилах больных лимфолейкозом и инфекционным мононуклеозом; они могут исчезать из циркуляции после излечения мононуклеоза. Активность ЩФ в нейтрофилах снижается при миелолейкозе, возрастает при полицитемии, миелопролиферативном синдроме.

Методы определения активности ЩФ

В течение длительного времени активность ЩФ в сыворотке крови исследовали в реакции с β -глицерофосфатом. Освобож-

денный в результате гидролиза фосфат определяли в реакции с фосфомолибденовой кислотой с образованием желтого комплекса, который при действии восстановителей (аскорбиновая кислота, эйконоген) переводили в фосфомолибденовый синий и колориметрировали при длине волны 620–640 нм. Метод привлекал использованием природного субстрата, но реакция многостадийна и длительна. В качестве субстрата для определения ЩФ предложено применять фенилфосфат с последующим определением освобожденного при гидролизе фенола в реакции с фосфорновольфрамовой кислотой или же при идентификации фенола в реакции с 4-аминоантипирином по образованию цветного хромогена. В настоящее время эти методы представляют только исторический интерес.

Первым кинетическим методом определения ЩФ, не требующим предварительной депротеинизации сыворотки крови, была реакция с п-нитрофенилфосфатом. В результате гидролиза субстрата образуется п-нитрофенол, имеющий желтую окраску; именно этот метод был впервые автоматизирован. В настоящее время этот метод определения активности ЩФ предложен в качестве референсного.

В детском возрасте активность ЩФ в сыворотке крови повышена в связи с более интенсивным ростом костей (у мальчиков активность ЩФ выше, чем у девочек); постоянный уровень устанавливается к 20 годам. В зрелом возрасте активность ЩФ в крови мужчин незначительно выше, чем у женщин. Активность ЩФ в сыворотке крови увеличивается при беременности, достигая максимума к моменту родов.

1.5. ЛИПИДЫ И ЛИПОПРОТЕИНЫ

Липиды нерастворимы в воде, поэтому они транспортируются в крови в комплексе с белками. Жирные кислоты в крови ассоциированы с альбумином, другие липиды транспортируются в составе липопротеинов (ЛП).

Один из факторов, способствующих развитию атеросклеротического процесса, — нарушение обмена ЛП. Этот факт на протяжении последних 25 лет послужил причиной широких исследований структуры ЛП, их синтеза, метаболических пре-

вращений и интернализации ЛП-частиц клетками. В многочисленных работах представлены данные о свойствах и составе ЛП-частиц разных классов, а также об особенностях биосинтеза и катаболизма липидных и белковых компонентов.

На рис. 1.5 представлены структурные формулы основных липидов плазмы крови.

Свободные, или незатерифицированные, жирные кислоты — основной поставщик энергии в организме. В крови человека присутствуют также насыщенные, мононенасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты (табл. 1.7).

Таблица 1.7. Жирные кислоты, присутствующие в плазме

Жирные кислоты	Название	Длина цепи	Источник
Насыщенные	Миристиновая	C 14:0	Кокосовое масло
	Пальмитиновая	C 16:0	Животный жир
	Стеариновая	C 18:0	Животный жир
Мононенасыщенные	Пальмитолеиновая	C 16:1 ω7	Жир
	Олеиновая	C 18:1 ω9	Сливочное масло
Полиненасыщенные (полиеновые)	Линоленовая	C 18:2 ω6	Растительное масло
	Арахидоновая	C 20:4 ω8	Растительное масло
	Эйкозапентаеновая	C 20:5 ω3	Рыбий жир

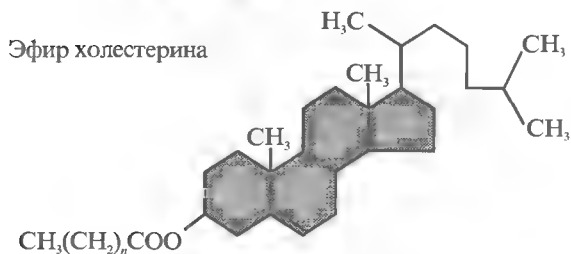
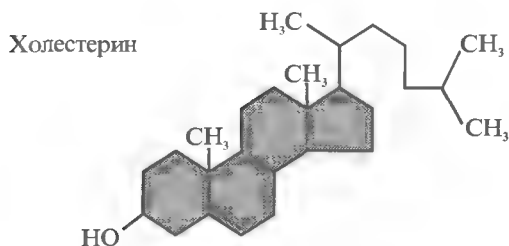
Примечание. В сокращенной формуле указаны количество атомов углерода и число двойных связей. Ближайшая к метильному концу двойная связь обозначена символом ω.

ТГ — это эфиры глицерина и жирных кислот; они так же, как и жирные кислоты, служат важным источником энергии.

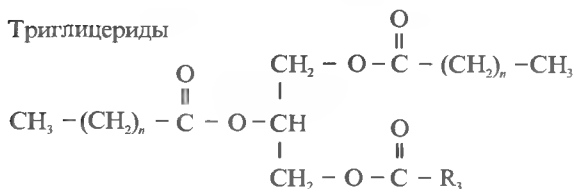
Фосфолипиды — эфиры глицерина или сфингозина с жирными кислотами и фосфорной кислотой. В состав фосфолипидов входят также азотсодержащие соединения (холин, этаноламин, серин) или другие гидрофильные группы, соединенные эфирной связью с фосфатом. Фосфолипиды — компоненты всех клеточных мембран и ЛП.



Жирные кислоты ($n \geq 14$)



Триглицериды



Фосфолипиды

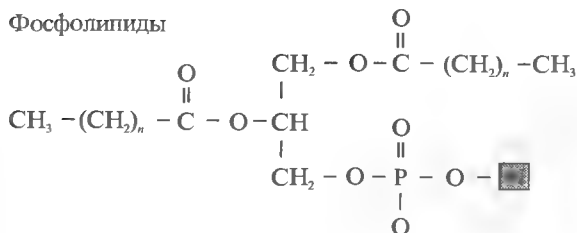


Рис. 1.5. Структурные формулы липидов.

Холестерин — стероид, на основе которого образуются стероидные гормоны и желчные кислоты. Около $2/3$ холестерина в крови представлено в форме эфиров холестерина и жирных кислот, около $1/3$ — в форме свободного холестерина. Свободный холестерин входит в состав всех клеточных мембран; в составе ЛП имеется как свободный, так и этерифицированный холестерин.

В клинической практике для выявления нарушений липидного обмена определяют уровень холестерина и ТГ в сыворотке крови.

ЛИПОПРОТЕИНЫ

Частицы ЛП — макромолекулярные комплексы, внутренняя часть которых содержит нейтральные липиды (ТГ и эфиры холестерина), а поверхностный слой состоит из фосфолипидов, неэтерифицированного холестерина и специфических липидтранспортных белков, называемых аполипопротеинами (апоЛП).

ЛП классифицируют на основании подвижности их в электрическом поле (при проведении ЭФ) или гидратированной плотности в условиях усиленной гравитации при препаративном ультрацентрифугировании (флотация или седиментация). При проведении ЭФ ЛП подразделяют на фракции, одна из которых остается на старте (хиломикроны), другие мигрируют к зонам глобулинов — β -ЛП, пре- β -ЛП, α -ЛП. По величине гидратированной плотности ЛП принято разделять на 5 классов: хиломикроны (ХМ), ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), ЛП промежуточной плотности (ЛППП), ЛП низкой плотности (ЛПНП), ЛП высокой плотности (ЛПВП). По электрофоретической подвижности ЛПОНП соответствуют пре- β -ЛП, ЛПНП — β -ЛП, ЛПВП — α -ЛП, а ХМ остаются на старте (рис. 1.6).

АпоЛП способствуют формированию мицелл ЛП в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, служат лигандами для специфических рецепторов на поверхности плазматической мембраны клеток и кофакторами (активаторами и ингибиторами) процессов липолиза и метаболизма ЛП в сосудистом русле (табл. 1.8).

В зависимости от роли апоЛП в организации первичных частиц ЛП и их последующих превращениях апопротеины услов-

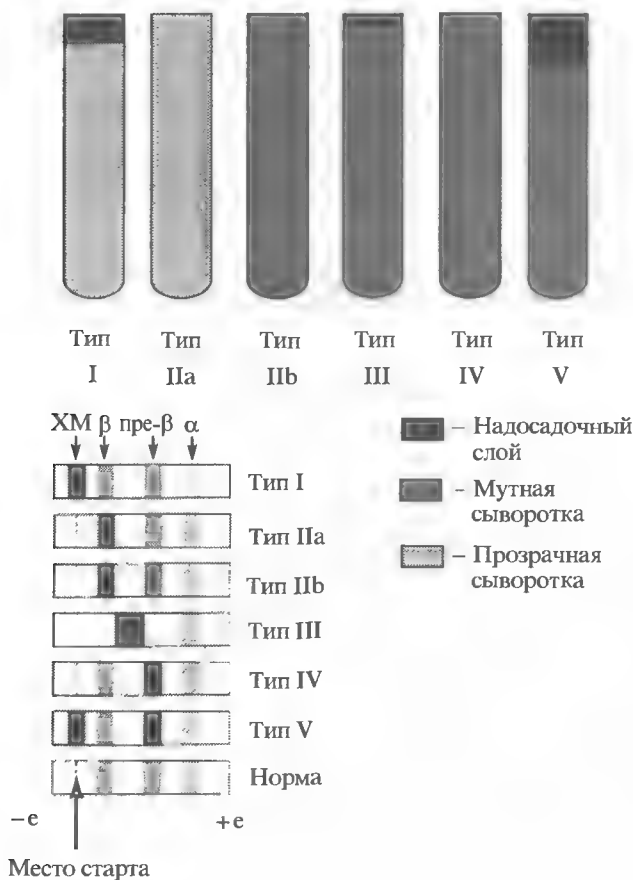


Рис. 1.6. Электрофорез липопротеинов и классификация гиперлипидемий.

но можно разделить на два класса. К одному из них следует отнести апоЛП, которые формируют мицеллярную структуру ЛП-комплексов и служат ядром ЛП-частиц. Особенностью таких апопротеинов является то, что белки не покидают ЛП-частицу, в формировании которой они участвуют. В эту группу апоЛП входят апоВ (апоВ-100 и апоВ-48) и апоА (А-I и А-II), ответственные за осуществление афферентного и эфферентного транспорта липидов. АпоВ — основной структурный белок богатых триглицеридами ЛП-частиц; он не покидает мицеллярный

Таблица 1.8. Свойства и функции аполипопротеидов

АпоЛП	Входит в состав	Место синтеза	Мол. масса, кД	Функции	С* в плазме, мг/л
A-I	ЛПВП, ХМ	Тонкая кишка, печень	28,3	Активация ЛХАТ, транспорт липидов, лиганд для ЛПВП-рецептора	100–1600
A-II	ЛПВП	Тонкая кишка, печень	17	Структурный белок, лиганд для ЛПВП-рецептора	300–500
A-IV	ХМ, ЛПВП, ЛПОНП	Тонкая кишка	46	Активация ЛХАТ, лиганд для ЛПВП-рецептора	150
B-100	ЛПНП, ЛППП, ЛПОНП	Печень	549	Перенос липидов из печени, связывание с В-, Е-рецептором	500–900
B-48	ХМ	Тонкая кишка	265	Перенос липидов из тонкой кишки	< 500
C-I	ХМ, ЛПОНП, ЛПВП	Печень	6,5	Активатор ЛХАТ	< 100
C-II	ХМ, ЛПОНП, ЛПВП	Печень	8,8	Активатор ЛПЛ	30–80
C-III	ХМ, ЛПОНП, ЛПВП	Печень	8,9	Ингибитор активности ЛПЛ	8–150
D	ЛПВП ₃		20	Активатор ЛХАТ	~100
E	ЛПОНП, ХМ, ЛПВП	Печень	36,5	Связывание с В- и Е-рецепторами	30–50
(a)	ЛП(a)	Печень	270–1000	Неизвестны	< 300

Примечание. С* — концентрация; мол. масса — молекулярная масса; ЛХАТ — лецитинхолестеринацилтрансфераза; ЛПЛ — липопротеинлипаза.

комплекс в процессе последовательных метаболических превращений ЛПОНП в ЛППП и далее в ЛПНП, накопление которых в сосудистой стенке служит патогенетическим звеном атероскле-

ротического процесса. Апопротеины А-I и А-II — основные белки ЛПВП. Основой предположения, что апоВ и апоА формируют разные по составу и функции классы ЛП, послужил факт, что апоВ и апоА не присутствуют вместе в длительно циркулирующих ЛП-частицах. Генетические нарушения синтеза этих апопротеинов — причина нарушений афферентного и эфферентного транспорта липидов.

К другому классу можно отнести апоЛП, их основная роль — регуляция метаболизма ЛП в сосудистом русле и процесса интернализации их клетками. Эти апопротеины содержатся в ЛП в значительно меньших количествах и в процессе взаимопревращения ЛП-частиц в кровеносном русле перемещаются между ЛП разных классов в виде белково-липидных комплексов. Метаболически активные апоЛП находятся в сосудистом русле дольше, чем частицы ЛП, в состав которых они были включены в момент синтеза. Основные представители группы метаболически активных апоЛП — апоЕ (с изоформами Е2, Е3, Е4) и апоС (С-I, С-II, С-III).

АпоЛП имеют большое значение для метаболизма ЛП, играя роль лигандов ЛП-частиц, взаимодействующих с клеточными рецепторами для специфических ЛП. АпоВ-100 и апоЕ взаимодействуют с рецептором ЛПНП, начиная абсорбционный эндоцитоз, сопровождающийся катаболизмом ЛПНП. АпоЕ взаимодействует с рецептором остаточных компонентов ХМ, играющего важную роль в удалении этих компонентов печенью. Предполагают, что апоА-I взаимодействует с рецептором к ЛПВП и облегчает удаление холестерина из периферических клеток для обратного транспорта в печень.

В плазме содержатся 4 основных класса ЛП: ХМ, ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП и несколько других ЛП, представленных в сравнительно низких концентрациях: ЛППП и ЛП(а). В табл. 1.9 представлены некоторые свойства ЛП.

ХМ синтезируются в кишечнике и служат для переноса экзогенных липидов. Основной белок насцентных (первичных) ХМ — апоВ-48. Вскоре после секреции ХМ энтероцитами в их состав в сосудистом русле включаются 2 дополнительных апопротеина, содержащихся в ЛПВП, — апоС-II и апоЕ. АпоС-II активирует гепаринзависимую липопротеинлипазу — фермент, фиксирован-

Таблица 1.9. Характеристика липопротеидов

Свойства	ХМ	ЛПОНП	ЛППП	ЛНП	ЛПВП
Плотность, г/мл	< 0,95	0,96–1,006	1,007–1,019	1,02–1,063	1,064–1,21
Диаметр, нм	100–1000	43	27	22	8
Электрофоретическая подвижность	Остаются на старте	Пре-β	Флозирующие β	β	α
Место образования	Тонкая кишка	Печень	Катаболизм ЛПОНП	Катаболизм ЛПОНП через ЛППП	Печень, тонкая кишка, катаболизм ХМ и ЛПОНП
Основная функция	Транспорт экзогенных ТГ	Транспорт эндогенных ТГ	Предшественник ЛППП	Транспорт холестерина	Обратный транспорт холестерина
Состав:					
ТГ	90%	65%	20%	5%	5%
холестерин	5%	15%	25%	50%	20%
фосфолипиды	4%	10%	35%	25%	25%
белок	1%	10%	20%	20%	50%
апопротеины	А, В-48, С, Е	В-100, С, Е	В-100, Е	В-100	А, С, Е

ный на эндотелии капилляров. Липопротеинлипаза гидролизует ТГ хиломикронов с образованием свободных жирных кислот. В процессе гидролиза ЛП частицы теряют около 96% своей массы, в основном за счет ТГ, а также апоЛП А и С. В результате этого ЛП-частица преобразуется в меньший по размерам, обогащенный холестерином остаток ХМ, в котором апоВ и апоЕ служат основными апоЛП. Образованные остаточные компоненты ХМ имеют гидратированную плотность ЛПОНП и ЛППП, и в норме из сыворотки крови их элиминируют гепатоциты посредством специфических рецепторов (апоЕ-рецепторы). Поэтому у здоровых лиц промежуточные формы ЛП имеют короткий период жизни и в физиологических условиях находятся в сыворотке крови в низкой концентрации. Однако при некоторых формах ГЛП происходит накопление ЛППП в сыворотке крови. В результате этих метаболических превращений транзиторная ГЛП, имеющая место в течение нескольких часов после приема пищи, устраняется, после чего утилизация экзогенных липидов идет в печени. Поступившие в печень липиды по жирнокислотному составу соответствуют экзогенным липидам. Секретируемые печенью в кровоток ЛП-частицы имеют жирнокислотный состав, свойственный организму человека.

ЛПОНП образуются в печени, секретируются гепатоцитами в кровоток и транспортируют эндогенные ТГ. Насцентные ЛПОНП имеют в составе только апоВ-100. В кровотоке в состав ЛПОНП также включаются апоЛП из ЛПВП — апоС-II и апоЕ. Исследования метаболизма показали, что радиоактивность, первоначально присутствующая во фракции ЛПОНП, быстро оказывается в ЛП-частицах с гидратированной плотностью ЛПНП. У здоровых людей практически все ЛПНП образованы в сосудистом русле из ЛПОНП. В ходе метаболизма богатых ТГ ЛП, содержащих апоВ, вследствие гидролиза ТГ ЛП меньшей плотности и больших размеров преобразуются в более плотные и меньшие по размеру ЛППП и затем ЛПНП. Некоторое количество остаточных компонентов ЛПОНП и ЛППП покидает сосудистое русло посредством взаимодействия со специфическими апоВ/Е-рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток. В процессе метаболического превращения ЛППП в ЛПНП, кроме гепаринзависимой липопротеинлипазы, принимает участие

еще один липолитический фермент — триглицеридлипаза печени. Этот фермент способен действовать не только как гидролаза ТГ, но и как фосфолипаза.

ЛПНП у человека содержат большую часть циркулирующего холестерина и транспортируют его к периферическим тканям для формирования мембран и процессов стероидогенеза. ЛПНП взаимодействуют с рецепторами на плазматической мембране клеток печени, надпочечников и периферических тканей, включая ГМК и фибробласты. После взаимодействия с рецептором ЛПНП подвергаются эндоцитозу и компоненты ЛПНП катаболизируются в лизосомах. В результате этих процессов образуются отдельные классы липидов; апобелки разрушаются до аминокислот.

ЛП(а) — сходная с ЛПНП, обогащенная холестерином и белком частица, содержит 2 молекулы апо(а) в дополнение к 1 молекуле апоВ. Увеличенный уровень ЛП(а) ассоциирован с ранним развитием ИБС: 50% больных ИБС имели уровень ЛП(а) выше 40 мг/л по сравнению с 17% в контрольной группе. Увеличение концентрации ЛП(а) в крови считают независимым фактором риска атеросклероза.

ЛПВП образуются несколькими путями, включая синтез и секрецию насцентных ЛПВП печенью и кишечником, в процессе липолиза ЛП, богатых ТГ, или в результате взаимодействия новообразованных апопротеинов с мембранами клеток. Насцентные ЛПВП — бислойные диски, состоящие из апоЛП и фосфолипидов. Свободный холестерин диффундирует в ЛПВП из клеток эндотелия, эритроцитов и других клеток. Кроме того, во время липолиза ЛПОНП или ХМ поверхностные липиды (фосфолипиды и холестерин) и белки (апоА-I, апоА-II, апопротеины группы С) переносятся во фракцию ЛПВП. Эти компоненты могут сформировать насцентные дискоидальные частицы ЛПВП или быть включены в уже существующие частицы ЛПВП. Дискоидальные насцентные ЛПВП в плазме крови взаимодействуют с ферментом ЛХАТ, в результате образуются эфиры холестерина, быстро перемещающиеся в ядро частицы; формируются сферические (зрелые) частицы ЛПВП — ЛПВП₃.

У человека большая часть эфиров холестерина, образованных в ЛПВП, переносится в более крупные ЛП, богатые ТГ. Белок,

переносящий эфиры холестерина, способствует обмену эфиров холестерина из ЛПВП на ТГ из ЛП, содержащих апоВ, что приводит к снижению содержания эфиров холестерина и увеличению содержания ТГ в ЛПВП. Комбинированный эффект липолиза и переноса липидов приводит к обогащению частиц ЛПВП дополнительными липидами и апопротеинами, в результате чего происходят увеличение размера и снижение плотности частиц ЛПВП, сопровождающиеся превращением частиц ЛПВП₃ в ЛПВП₂. Частицы ЛПВП₂ затем подвергаются воздействию триглицеридлипазы печени — фермента, обнаруженного в основном в эндотелиальных клетках синусоидов печени. Триглицеридлипаза печени обладает как триглицеридгидролазной, так и фосфолипазной активностью, что приводит к снижению содержания ТГ и фосфолипидов в ЛПВП и уменьшению размера частицы.

Таким образом, ЛП плазмы крови, традиционно разделяемые на классы физическими, химическими и иммунохимическими методами, метаболически составляют единую систему.

Содержание классов ЛП в сыворотке крови можно измерить количественно. Такие измерения проводят методом аналитического ультрацентрифугирования, который требует сложного аналитического оборудования. Возможно также рассчитать концентрацию ЛП, исходя из анализа каждого компонента. Этот подход требует количественного выделения и очистки каждого класса ЛП методом препаративного ультрацентрифугирования. Уровень ЛП в плазме крови в клинической биохимии обычно оценивают по содержанию в них холестерина. Содержание ТГ в отдельных классах ЛП, как правило, не исследуют, поскольку оно подвержено более значительным колебаниям, чем уровень холестерина. Следует подчеркнуть, что большая часть эпидемиологических данных о связи ЛП и развития заболеваний ССС основана на измерениях именно содержания холестерина в отдельных классах ЛП.

Соотношение общего холестерина плазмы крови и холестерина основных классов ЛП можно выразить следующей формулой:

$$\begin{aligned} \text{холестерин крови} = & \text{холестерин ЛПОНП} + \\ & + \text{холестерин ЛПНП} + \text{холестерин ЛПВП}. \end{aligned}$$

Для измерения холестерина классов ЛП определяют общий холестерин и ТГ сыворотки крови и концентрацию холестерина ЛПВП в супернатанте после преципитации ЛП, содержащих апоВ (ЛПОНП и ЛПНП). Концентрацию холестерина ЛПНП рассчитывают по формуле Фридвальда:

холестерин ЛПНП = общий холестерин —

— холестерин ЛПВП — холестерин ЛПОНП.

Для ориентировочной оценки концентрации холестерина ЛПОНП используют величину ТГ/5, если концентрации холестерина и ТГ выражены в мг/дл, или ТГ/2,2, если концентрации холестерина и ТГ выражены в ммоль/л. Применение этой формулы при концентрации ТГ выше 400 мг/дл приводит к завышению содержания холестерина ЛПОНП и занижению содержания холестерина ЛПНП. Для оценки распределения ЛП у больных с очень высоким уровнем ТГ и наличием значительного количества ХМ необходимо предварительное ультрацентрифугирование для отделения ХМ и ЛПОНП. После отделения фракции ЛПОНП и преципитации ЛПНП в супернатанте можно определить концентрацию холестерина ЛПВП.

Достоверный метод оценки содержания отдельных классов ЛП в сыворотке крови — метод ЭФ на одной из поддерживающих сред: геле агарозы, геле полиакриламида, ацетате целлюлозы, бумаге. Эти методы позволяют получить только процентное соотношение отдельных классов ЛП, включая ХМ, β -, пре- β - и α -ЛП. ЭФ — основа фенотипирования ГЛП по классификации, предложенной Фредриксоном (табл. 1.10). Окончательное решение о фенотипе ГЛП проводят по данным ЭФ ЛП с учетом концентрации в крови холестерина и ТГ, а также холестерина ЛПНП.

Клиническое значение определения липопротеинов в крови

Многочисленными клиническими и эпидемиологическими исследованиями установлено, что повышение уровня холестерина в крови — один из основных факторов риска атеросклероза. Раз-

Таблица 1.10. Классификация гиперлиппротеинемий, принятая ВОЗ

Тип	ХМ	ЛПОНП	ЛПНП	Холестерин	ТГ	Характер нарушений
I	↑	N	N	N	↑↑	↑ ХМ
II _a	—	N	↑↑	↑↑	N	↑ ЛПНП
II _b	—	↑	↑	↑	↑	↑ ЛПНП и ЛПОНП
III	—	Флотирующие β-ЛП		↑	↑	↑ ОКХ и ЛППП
IV	—	↑	N	N (↑)	↑	↑ ЛПОНП
V	↑	↑	N	N (↑)	↑↑	↑ ХМ и ЛПОНП

Примечание. ↑ — повышение; ОКХ — остаточные компоненты ХМ.

витие ГЛП может быть обусловлено генетическими аномалиями и факторами среды (первичные ГЛП), а также такими заболеваниями, как сахарный диабет, патология печени, почек, гормональными нарушениями (вторичные ГЛП). В формировании первичных ГЛП основную роль играет наследственная предрасположенность. В популяции белых американцев вариабельность уровня холестерина на 63% обусловлена генетической изменчивостью. По данным обследования моно- и дизиготных близнецов в России, изменчивость общего холестерина на 82% обусловлена генетическими факторами.

В настоящее время изучено много наследственных аномалий обмена ЛП, но только для некоторых известны точные биохимические дефекты, позволяющие диагностировать заболевание. К таким формам ГЛП относят семейную дисбеталипопротеинемию (ГЛП типа III) и семейную гиперхиломикронемиию (ГЛП типа I).

СЕМЕЙНАЯ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ

Среди пациентов с первичной гиперхолестеринемией наиболее изучены нарушения обмена липидов при семейной гиперхолестеринемии. Это наследственное моногенное заболевание, при котором отмечают высокий уровень холестерина в сыворотке крови и ЛПНП, а также раннее развитие атеросклероза и ИБС.

Тип наследования при семейной гиперхолестеринемии — ауто-сомно-доминантный. У гомозигот заболевание протекает более тяжело, чем у гетерозигот. У 60% гомозигот ИБС развивается в возрасте до 10 лет. Уровень холестерина сыворотки крови у гетерозигот варьирует от 250 до 550 мг/дл, у гомозигот отмечено повышение до 800 мг/дл. Ксантомы сухожилий считают патогномоничными для больных с семейной гиперхолестеринемией. Частота распространения семейной гиперхолестеринемии среди популяций Европы и Америки составляет 1 : 1 000 000 для гомозигот и 1 : 500 для гетерозигот, хотя существуют популяции с более высокой частотой проявления заболевания — 1 : 100 (канадские французы, финны, европеиды в ЮАР).

Молекулярный дефект, определяющий развитие семейной гиперхолестеринемии, был описан Брауном и Гольдштейном. Причина гиперхолестеринемии — дефект ЛПНП-рецептора, вызывающий резкое снижение поглощения ЛПНП, вследствие чего происходят накопление частиц ЛПНП и соответственно возрастание в крови их концентрации. Степень снижения активности ЛПНП-рецептора у пациентов с семейной гиперхолестеринемией коррелирует с уровнем холестерина ЛПНП, но не с клиническими проявлениями заболевания (ранние проявления ИБС, наличие сухожильных ксантом). Установлено 4 типа генетических дефектов ЛПНП-рецептора:

- полное отсутствие белка-рецептора;
- нарушение транспорта белка-рецептора к поверхности клетки;
- дефект рецептора, препятствующий связыванию ЛПНП;
- дефект рецептора, препятствующий его интернализации после связывания с ЛПНП. В настоящее время выявлено более 150 мутаций этого белка.

Несмотря на установление генетического дефекта, определяющего развитие семейной гиперхолестеринемии, характеристику клинических проявлений заболевания и нарушений липидного обмена, критерии диагностики семейной гиперхолестеринемии окончательно не определены. К сожалению, определение активности ЛПНП-рецептора для диагностики семейной гиперхолестеринемии не нашло широкого распространения. Полагают, что использование анализа ДНК для диагностики семейной гиперхо-

лестеринемии нецелесообразно вследствие большого количества мутаций. Увеличение уровня холестерина — нечеткий диагностический критерий семейной гиперхолестеринемии, поскольку описаны пациенты, имеющие сниженную активность апоВ-рецептора и нормальный уровень холестерина.

Снижение связывания частиц ЛПНП с рецептором может быть обусловлено не только генетическими дефектами, вызывающими отсутствие ЛПНП-рецептора или его функциональные нарушения, но и наследственными изменениями лиганда — апоВ-100. Анализ ДНК пациентов с гиперхолестеринемией позволил выявить мутацию гена, кодирующего синтез апоВ-100, в результате которой аргинин в положении 3500 заменен глутамином. Эта патология получила название «наследственный дефект апоВ-100». Частота распространения этого дефекта в популяции сопоставима с таковой для семейной гиперхолестеринемии (1 : 500), по другим данным значительно ниже (1 : 1300).

СЕМЕЙНАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ГИПЕРЛИПИДЕМИЯ

Термин «семейная комбинированная гиперлипидемия» (СКГЛ) впервые предложен Гольдштейном и соавт. в 1973 г. для характеристики наследственного нарушения липидного обмена, при котором у пробанда и его родственников I степени родства отмечают разные типы ГЛП (II_a, II_b, IV). Нарушения липидного обмена проявляются обычно после 20 лет, но могут быть выявлены и в более раннем возрасте. Частота встречаемости СКГЛ в популяции составляет, по данным разных исследователей, от 0,5 до 2%, тогда как среди больных инфарктом миокарда — 5%, а среди пациентов в возрасте до 60 лет с ангиографически документированной ИБС — 15–20%. Изучение родословных показало, что СКГЛ — наследственное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования. Несмотря на многочисленные исследования, биохимический маркер СКГЛ не определен; точный молекулярный дефект, приводящий к формированию СКГЛ, пока неизвестен.

ПОЛИГЕННАЯ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ

Среди наследственных нарушений липидного обмена наиболее распространена полигенная гиперхолестеринемия. При этом заболевании распределение уровней холестерина у членов таких

семей сдвинуто в сторону более высоких значений, чем в среднем в популяции. Кроме того, распределение унимодально, что указывает на отсутствие моногенного наследования. Полагают, что наличие полигенной гиперхолестеринемии обусловлено суммарным влиянием нескольких генов, при этом проявление полигенной гиперхолестеринемии в большой степени провоцируют средовые факторы, особенно характер питания. Термин «полигенная гиперхолестеринемия» применяют для характеристики пациентов с наследственной гиперхолестеринемией с неустановленным генетическим дефектом и при отсутствии признаков моногенного наследования.

Учитывая полигенный характер наследования гиперхолестеринемии, генетический дефект, определяющий заболевание, и его биохимический маркер (или маркеры) неизвестны. Распространенность полигенной гиперхолестеринемии в популяции и среди больных ИБС зависит от значений уровня холестерина, принятых в качестве нормальных: при снижении нормы доля пациентов с полигенной гиперхолестеринемией, естественно, увеличивается.

СЕМЕЙНАЯ ГИПЕРТРИГЛИЦЕРИДЕМИЯ

Семейная гипертриглицеридемия — наследственное нарушение липидного обмена, при котором у пробанда и его родственников выявляют умеренное или значительное увеличение уровня ТГ при нормальной концентрации холестерина ЛПНП — ГЛП IV или V типа. Заболевание обычно проявляется после 30 лет. У таких пациентов часто, но не всегда отмечают снижение уровня холестерина ЛПВП. Тип наследования — аутосомно-доминантный. Семейная гипертриглицеридемия встречается в популяции с частотой 1%, а у больных ИБС в возрасте до 60 лет с частотой 5–8%. Генетический дефект, обуславливающий развитие семейной гипертриглицеридемии, и биохимический маркер этого заболевания в настоящее время неизвестны.

Диагностические критерии гиперлиппротеинемий

Для установления ГЛП необходимы четкие биохимические критерии. В настоящее время есть два подхода к этому вопросу. Долгие годы нормальный уровень холестерина и ТГ сыворотки

крови, а также холестерина ЛПНП и ЛПВП устанавливали по результатам эпидемиологических исследований. Для каждой популяции определяли свои критерии нормы показателей липидного обмена в зависимости от 5–10% минимальных и максимальных значений при гауссовском распределении. Гиперлипидемией в этом случае считали такую концентрацию холестерина и ТГ, которая превышала 90 или 95% уровень на графике Гаусса (в соответствии с полом и возрастом). Именно эти критерии значений нормы положены в основу классификации ГЛП, предложенной Фредриксоном и соавт. и после некоторых дополнений принятой ВОЗ. Впоследствии, учитывая накопленные данные о взаимосвязи повышенного уровня холестерина и риска ИБС, экспертными группами Национальной образовательной программы по холестерину в США и Европейского общества по изучению атеросклероза предложена иная классификация ГЛП. В зависимости от риска ИБС предложено выделять желаемый уровень холестерина в крови $< 5,2$ ммоль/л, погранично-высокий $5,2$ – $6,2$ ммоль/л и высокий $> 6,2$ или $> 6,5$ ммоль/л соответственно для мужчин и женщин старше 20 лет. На основании названных критериев предложено выделять умеренную гиперхолестеринемию ($6,2$ – $7,5$ или $6,5$ – $7,8$ ммоль/л) и тяжелую гиперхолестеринемию ($> 7,5$ или $> 7,8$ ммоль/л).

Соответственно изменены критерии и для холестерина ЛПНП, тогда как уровень нормы для ТГ и холестерина ЛПВП оставлен прежним. Хотя для американской популяции умеренная гиперхолестеринемию соответствует 75–95% уровню гауссовского распределения, эти критерии используют для типирования ГЛП в США и России. Выбор более низких значений нормы, несомненно, оправдан с точки зрения первичной и вторичной профилактики ИБС. Кроме того, применение единых критериев для диагностики позволяет сопоставить распространенность ГЛП в популяциях с различным средним уровнем холестерина. С другой стороны, 95% лиц с ГЛП, установленной по эпидемиологическим критериям, имеют наследственно обусловленную ГЛП. Соответственно по мере снижения нормальных значений будет возрастать доля лиц, ГЛП которых обусловлена только факторами среды. В этой связи при поиске пациентов с тяжелыми наследственными формами гиперхолестеринемии

по-прежнему применяют эпидемиологически установленный 90–95% уровень холестерина в соответствии с полом и возрастом пациента.

Гиполиппротеинемии

Гиполиппротеинемии возникают в результате некоторых дефектов, регулирующих липидный метаболизм ферментов либо мутаций гена апоВ.

Абеталипопротеинемия и гипобеталипопротеинемия — наследуемые расстройства, вызванные мутациями гена апоЛП В, главного апоЛП ХМ и ЛПОНП. Специфическая терапия этих расстройств не разработана.

Абеталипопротеинемия: в крови отсутствуют β -липопротеины, ХМ, ЛП с плотностью ниже 1,063 (ЛПНП и ЛПОНП), эритроциты имеют множественные шиповидные выросты (акантоциты), развивается дефицит витаминов Е и А (результат отсутствия ЛПНП, транспортирующих жирорастворимые витамины). Часты нарушения всасывания в кишечнике, а также нарушения координации (вследствие демиелинизации аксонов), атаксия, нистагм, пигментная дегенерация сетчатки и отставание в умственном развитии. Стеаторея возникает вследствие недостатка апоВ, определяющего образование ХМ в клетках кишечника. При биопсии тонкой кишки обнаруживают жировые включения в эпителиальных клетках.

Гипобеталипопротеинемия сопровождается уменьшением содержания β -липопротеинов и часто протекает бессимптомно. Содержание ЛПВП или в норме или увеличено, триглицеридов 70–120 мг%, ЛПНП 20–70 мг%. Всасывание жиров обычно не нарушено.

ТРИГЛИЦЕРИДЫ

Триглицериды (ТГ; триацилглицерины) — эфиры трехатомного спирта глицерина и длинноцепочечных жирных кислот, среди которых в организме человека доминируют стеариновая, пальмитиновая, пальмитоолеиновая, олеиновая, линолевая кислоты, реже присутствуют полиненасыщенные линоленовая и арахидоновая кислоты. Клетки тканей человека не синтезируют лино-

левую кислоту, поэтому ее относят к эссенциальным кислотам. Распределение жирных кислот в молекуле ТГ зависит от длины цепи и степени ненасыщенности. В средней позиции чаще находится кислота с наибольшей длиной цепи и наибольшим числом двойных связей, крайние позиции обычно занимают насыщенные кислоты.

Жирные кислоты поступают в организм с пищей в форме триацилглицеринов, которые в тонкой кишке под действием липазы подвергаются гидролизу. Образовавшиеся глицерин и свободные жирные кислоты абсорбируются клетками эпителия, где происходит ресинтез ТГ. Формирование ТГ происходит в печени; жирные кислоты поступают в печень из жировой ткани или синтезируются в гепатоцитах. Жирнокислотный состав ТГ в организме в большей степени, чем фосфолипидов, зависит от состава жиров пищи. Длинноцепочечные жирные кислоты, входящие в состав ТГ, — оптимальный источник макроэргических соединений, образуемых при β -окислении жирных кислот в митохондриях. Большинство органов реализует именно ТГ для покрытия энергетических потребностей. Исключение составляет мозг; его энергетическое обеспечение происходит за счет метаболизма глюкозы (аэробного гликолиза).

В плазме крови ТГ, как и другие липиды (холестерин и его эфиры, фосфолипиды), транспортируются в составе макромолекулярных мицеллярных комплексов — ЛП. ТГ присутствуют во всех классах ЛП, в ЛПОНП и ХМ они составляют большую часть липидов. При определенном опыте внешний вид плазмы позволяет ориентировочно определить содержание в ней ТГ. Если плазма крови прозрачна, уровень ТГ в ней не превышает 180–200 мг%; выраженная опалесценция плазмы крови характерна для гипертриглицеридемии порядка 300–500 мг%, при уровне ТГ, превышающем 600 мг%, плазма и сыворотка крови непрозрачны. Наличие ХМ в крови можно выявить при проведении «теста стояния» — появление «крема» на поверхности плазмы при ее хранении в течение 16 ч при температуре 4 °С. Прозрачная сыворотка крови и наличие ХМ свидетельствуют о I типе ГЛП, отсутствие ХМ при выраженной опалесценции или молочном цвете сыворотки указывает на IV тип ГЛП; присутствие ХМ на поверхности образца сыворотки с выраженной опалесценцией

или молочного цвета позволяет предположить у пациента III или V тип ГЛП.

Клиническое значение определения концентрации ТГ

Необходимо помнить, что ХМ могут присутствовать в сыворотке крови здорового человека, принимавшего пищу менее чем за 12 ч до взятия крови. В силу значительного влияния на уровень ТГ субстратной индукции уровень ТГ в крови может изменяться в течение суток в значительных пределах. Гипертриглицеридемия может быть охарактеризована как физиологическая или патологическая. Физиологическая гипертриглицеридемия возникает после приема пищи и может продолжаться 12–14 ч; степень ее проявления зависит от характера и количества принятой пищи. Гипертриглицеридемия во II–III триместре беременности также физиологическая. Патологическая гипертриглицеридемия по своим патогенетическим характеристикам может быть дифференцирована на первичную и вторичную. Первичная гипертриглицеридемия обусловлена генетическими нарушениями метаболизма ЛП или усиленной субстратной индукцией (переедание). Нарушения обмена ТГ, возникающие как осложнение основного патологического процесса, относят к вторичным гипертриглицеридемиям.

Известно несколько первичных форм гипертриглицеридемий, обусловленных наследственными дефектами метаболизма ЛП: семейная гипертриглицеридемия, семейная комбинированная гиперлипидемия, семейная дисбеталипопротеинемия (тип III ГЛП), семейная гиперхиломикронемия (тип I ГЛП). К первичным формам нарушения обмена ТГ могут быть отнесены и гипотриглицеридемии, вызванные генетическими изменениями синтеза или секреции апоВ. При этих заболеваниях (наследственной абеталипопротеинемии или гомозиготной гипобеталипопротеинемии) содержание триглицеридов может быть снижено до 19–20 мг%.

Развитие вторичных гипертриглицеридемий отмечено при сахарном диабете, гипотиреозе, нефротическом синдроме, приеме пероральных контрацептивов, лечении глюкокортикоидами. Как правило, патогенетическое лечение, направленное на основной патологический процесс, сопровождается снижением уровня ТГ.

Коррекция уровня гликемии инсулином или пероральными гипогликемическими препаратами способствует нормализации содержания ТГ в крови. При купировании нефротического синдрома уровень ТГ в крови также снижается, но иногда остается повышенным в течение длительного времени. Прекращение приема гормональных контрацептивов, глюкокортикоидов и ряда других препаратов (β -блокаторы) также способствует нормализации уровня ТГ.

Гипертриглицеридемию отмечают при жировой инфильтрации печени. В основе патогенеза этого заболевания лежит повышенное поступление свободных жирных кислот в печень (усиленный липолиз) или их усиленный синтез (ресинтез), с одной стороны, и нарушение секреции ЛПОНП печенью — с другой. Многие токсичные соединения, алкоголь, фармакологические препараты способствуют нарушению синтеза апоЛП, в частности апоВ, в отсутствие или при недостатке которых не происходит формирования ЛПОНП. В этих условиях поступающие из крови или вновь синтезируемые ТГ оказываются в печени, формируя структуру «свиной печени», вызывая ее жировую инфильтрацию и цирроз.

Гипертриглицеридемию обычно отмечают у пациентов с острым панкреатитом. Однако увеличение уровня ТГ нехарактерно для острого поражения поджелудочной железы, напротив, выраженная гипертриглицеридемия (> 1000 мг%), как первичная, так и вторичная, способствует развитию заболеваний поджелудочной железы и зачастую осложняется панкреатитом. Панкреатит считают одним из клинических проявлений семейных форм гипертриглицеридемии. Развитие панкреатита часто отмечают у больных сахарным диабетом, при алкоголизме, у женщин, принимавших гормональные контрацептивы.

Данные о взаимосвязи гипертриглицеридемии и ИБС противоречивы, хотя эпидемиологическими исследованиями на многих популяциях показана независимость ТГ как фактора риска ИБС. Оценка независимости ТГ как фактора риска ИБС крайне затруднена вследствие наличия отрицательной зависимости между уровнем ТГ и холестерина ЛПВП, независимого отрицательного фактора риска ИБС. Тем не менее если повышение концентрации ТГ и не является независимым фактором риска ИБС, тесная

связь метаболизма ТГ и ЛПВП не дает оснований отрицать значение гипертриглицеридемии в генезе ИБС. Биохимической основой этого может быть накопление в крови ЛППП, обладающих выраженной атерогенностью.

Значение гипертриглицеридемии в формировании патологии периферических и церебральных сосудов в отличие от ИБС более определено. Исследования японских специалистов показали, что в этой популяции при низком уровне холестерина крови и частоты возникновения инфаркта миокарда гипертриглицеридемия — фактор риска патологии периферических артерий. Аналогичные данные получены и на других популяциях.

Исследование содержания ТГ в сыворотке крови имеет много общего с определением холестерина. Как холестерин, так и ТГ — структурные компоненты ЛП, которые необходимо разрушить, чтобы сделать липиды доступными для химических или ферментативных реакций. Оба соединения гидрофобны, обладают низкой растворимостью в водных растворах. Однако в определении содержания в сыворотке крови ТГ имеются и существенные отличия: для оценки содержания ТГ определяют глицерин, освободившийся после гидролиза ТГ.

Методы определения содержания ТГ в крови

Существуют два способа определения содержания ТГ в сыворотке крови — химический и ферментативный; каждый из них включает многочисленные методические приемы. В настоящее время определение ТГ возможно также методом «сухой химии».

Химические методы. Для определения ТГ прямые химические методы (без предварительной экстракции органическим растворителем) неприемлемы, так как в сыворотке крови присутствуют многие соединения, которые в процессе химического гидролиза (омыления жирных кислот) также могут превращаться в глицерин, например фосфолипиды и глюкоза. В этой связи в химических методах определения ТГ первая стадия — экстракция ТГ и удаление интерферирующих соединений. Для экстракции используют органические растворители: метанол, этанол, изопропанол и хлороформ. Растворители денатурируют ЛП и способствуют диссоциации ТГ. Интерферирующие соединения

удаляют экстракцией органическими растворителями (гексан, нонан) или при использовании адсорбентов (цеолит, кремниевая кислота, флоризил).

Вторая стадия химического определения ТГ — гидролиз ТГ с образованием глицерина и свободных жирных кислот — обычно осуществляется реакцией с этанольным раствором гидроокиси калия при повышенной температуре (омыление).

После окисления глицерина в формальдегид его определяют одной из перечисленных ниже реакций:

- реакцией формальдегида со смесью хромотроповой и серной кислот (измерение при 570 нм);
- реакцией со смесью фенилгидразина, цианида железа и соляной кислоты (измерение при 540 нм);
- реакцией со смесью 3-метил-2-бензотиазолина и хлорида железа (измерение при 620 нм);
- реакцией с ацетатом аммония и ацетилацетоном.

Продукт реакции может быть измерен колориметрически при 412 нм или флюорометрически. Более распространен флюорометрический метод, он адаптирован к полуавтоматическим анализаторам.

Ферментативные методы. При ферментативных методах определения ТГ разрушение ЛП-комплексов, гидролиз ТГ проводят в присутствии детергентов, липазы и протеазы. В условиях ферментативного гидролиза ТГ не происходит освобождения глицерина из фосфолипидов и глюкозы, следовательно, повышается специфичность определения.

Для определения глицерина, образованного при гидролизе ТГ, применяют множество методических приемов, используя в каждом случае ряд сопряженных ферментативных реакций. Ферментативные методы позволяют определять ТГ по уменьшению или увеличению концентрации НАДН при длине волны 340 нм. Предложены и колориметрические методы: восстановление солей тетразолия нитросинего при помощи НАДН и измерение образованного формазана (длина волны 505 нм) или окисление 4-аминофеназона в присутствии пероксидазы с образованием хромогена (длина волны 510 нм).

Использование ферментативного метода позволяет избежать применения органических растворителей, очистки экстрактов

для удаления интерферирующих соединений, использования концентрированной гидроокиси калия и проведения гидролиза при высокой температуре. По сравнению с химическими методами ферментативное определение ТГ обладает более высокой специфичностью и точностью, что удобно для автоматизации.

Основные сложности ферментативного определения ТГ — возможность неполной деструкции комплекса ЛП и неполного гидролиза с освобождением свободного глицерина. Из экспериментальных работ известно, что ТГ, образованные насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами, с разной скоростью гидролизуются при действии липазы; соотношение коротко- и длинноцепочечных жирных кислот также имеет значение для скорости гидролиза.

Поскольку определение содержания ТГ в сыворотке крови как в химических, так и ферментативных методах основано на освобождении глицерина, необходимо принимать во внимание содержание свободного глицерина в сыворотке крови. Для большинства свежих образцов сыворотки крови при уровне ТГ ниже 700 мг% изменение свободного глицерина не оказывает существенного влияния на получаемые результаты. Накопление свободного глицерина в сыворотке крови происходит при сахарном диабете, некоторых видах патологии печени, в условиях гемодиализа, при острой и хронической почечной недостаточности, приеме нитроглицерина, терапии гепарином. Острые инфекции, кратковременные состояния стресса, прием лекарственных препаратов, обладающих липолитическим свойством, значительно увеличивают содержание свободного глицерина в крови. Спонтанный гидролиз ТГ происходит и в сыворотке крови, особенно при хранении образцов при комнатной температуре.

Для точности определения уровня ТГ следует измерить уровень свободного глицерина и результат вычесть из общего значения. При определении уровня свободного глицерина колориметрическим и флуорометрическим методами он может быть разным в одной и той же пробе плазмы крови. Флуорометрия дает более стабильные результаты, но менее специфична: в условиях почечной недостаточности и активированного протеолиза флуоресцирующие пептиды могут значительно завышать результаты.

Для получения точных данных при определении ТГ необходимо использовать первичный стандарт — раствор триацилглицеринов в органических растворителях. В качестве стандарта обычно применяют триолеин, хотя смесь триолеина и трипальмитина (2:1 по массе) более сходна по степени ненасыщенности жирных кислот с ТГ человека. В качестве стандарта раствор триолеина в изопропанолe можно применять только для химических методов исследования, так как изопропанол неспецифически активизирует ферменты, используемые для определения ТГ. В этой связи при определении ТГ ферментативными методами используют вторичные стандарты (калибраторы) — сыворотки крови человека, содержание ТГ в которых определено референсными методами, с применением первичных стандартов.

Взятие крови для определения ТГ необходимо проводить через 12–14 ч после приема пищи. Значения ТГ, определенные в плазме крови, на 2–4% ниже таковых в сыворотке. Это обусловлено разведением за счет жидкости, теряемой эритроцитами под действием антикоагулянта. Некоторые антикоагулянты (фторид, цитрат и оксалат) вызывают более значительную потерю жидкости эритроцитами, что находит отражение в большем снижении значений ТГ (до 10%). В качестве антикоагулянта при определении ТГ предпочтительнее использовать ЭДТА (1 мг/мл цельной крови). Для уменьшения эффекта разбавления необходимо центрифугировать образцы крови и отделить полученную плазму в течение 2 ч после взятия крови.

ХОЛЕСТЕРИН

Холестерин, 3- β -гидроксистерин-5-ен, — мононенасыщенный стерин состава $C_{27}H_{46}O(OH)_5$; по химической структуре это одноатомный вторичный спирт (холестерол). Молекула холестерина имеет в основе структуру циклопентанпергидрофенантрена, в третьем положении расположена гидроксильная группа, присутствуют двойная связь между 5-м и 6-м углеродными атомами и боковая алифатическая цепь из 8 атомов углерода. Термин «холестерин» определяет источник, из которого он впервые был выделен (от греч. chole — желчь). Молекулярная масса холестерина 387 Д, в чистом виде это порошок белого цвета. Холестерин

хорошо растворяется в органических растворителях (особенно хорошо в спиртах с 6–7 атомами углерода). Растворимость холестерина в воде крайне низкая, составляет 4,7 мкмоль/л при 25 °С.

Химическая структура холестерина ограничивает число биохимических реакций, в которые он вступает. Основное биохимическое превращение холестерина (как спирта) — образование эфирной связи с кислотами, в частности со свободными жирными кислотами, с формированием эфиров холестерина. 80% холестерина в организме составляет свободный холестерин, почти весь он входит в состав биологических мембран. В то же время в сыворотке крови 2/3 холестерина представлено в форме эфиров с жирными кислотами.

Холестерин входит в состав всех живых клеток. В биологических мембранах холестерин выполняет структурную роль. Со структурой неразрывно связана и его функция, определяющая проницаемость мембраны и создание микроокружения для встроенных в мембрану ферментов. Важная функция холестерина — его роль как предшественника синтеза стероидных гормонов.

Все клетки организма синтезируют холестерин из ацетата, последовательно проходя стадии ацетоацетата, метилглутарил-КоА и, наконец, мевалоновой кислоты. Превращение метилглутарил-КоА в мевалоновую кислоту при действии гидроксиметилглутарил-КоА-(ГМГ-КоА)-редуктазы — ключевой момент синтеза холестерина. Образованная мевалоновая кислота может быть использована только в синтезе холестерина, поэтому активация ГМГ-КоА-редуктазы всегда приводит к гиперхолестеринемии.

Основная масса холестерина синтезируется в печени и поступает с пищей; в сутки организм синтезирует 1 г холестерина. Часть холестерина окисляется в желчные кислоты, часть удаляется с калом. Существуют реципрокные отношения между холестерином, поступающим с пищей, и синтезируемым в организме. Холестерин, как и другие липиды, транспортируется в сыворотке крови в составе ЛП.

Основную массу холестерина сыворотки крови содержат ЛПНП; их основной апоЛП — апоВ-100. ЛПНП — основная форма транспорта холестерина и полиеновых жирных кислот от

печени к периферическим тканям. ЛПНП при взаимодействии с апоВ-рецепторами плазматической мембраны подвергаются интернализации; в липосомах происходит деструкция ЛП-частицы с освобождением свободного холестерина. Клетка использует холестерин для построения мембран, часть его этерифицируется. Молекулы холестерина плазматических мембран, оказавшись в сыворотке крови, начинают афферентный путь к печени в составе ЛПВП. Поступивший в печень в составе ЛПВП холестерин подвергается микросомальному гидроксигированию, превращаясь в желчные кислоты, а также экскретируется с желчью в форме свободного холестерина или его эфиров.

На уровень холестерина влияют характер пищи и прием алкоголя, интенсивные физические тренировки, фармакологические препараты, включая гормональные контрацептивы, стероиды, гиполипидемические препараты. Сезонные и дневные вариации не оказывают существенного влияния на уровень холестерина в сыворотке крови. Индивидуальные колебания значений холестерина составляют, по данным разных авторов, от 3 до 14%. Суточные колебания уровня холестерина у мужчин и женщин (0,7–4,3%) значительно ниже, чем колебания в течение 1 мес (2,0–12,2%) и 1 года (3,9–10,9%).

Клиническое значение гиперхолестеринемии

Гиперхолестеринемия — наиболее документированный фактор риска коронарного атеросклероза. Это подтверждено многочисленными эпидемиологическими и клиническими исследованиями, установившими связь гиперхолестеринемии с коронарным атеросклерозом, частотой клинических проявлений ИБС (стенокардии и инфаркта миокарда). При вторичной профилактике коронарного атеросклероза в ходе гиполипидемической терапии продемонстрирована регрессия клинической картины ИБС и кардиосклероза при нормализации уровня холестерина сыворотки крови. Для более детальной характеристики факторов риска коронарного атеросклероза исследуют содержание холестерина в отдельных классах ЛП; наибольшее распространение получило исследование холестерина ЛПНП и ЛПВП, являющихся достоверными факторами соответственно риска и антириска коронарного атеросклероза.

Исследование холестерина не несет диагностической информации относительно определенного заболевания, а характеризует патологию обмена липидов и ЛП. Определение уровня холестерина имеет социальное значение, так как повышенный популяционный уровень холестерина требует осуществления организационных мероприятий по первичной профилактике коронарного атеросклероза. Наиболее высокие цифры гиперхолестеринемии отмечаются при генетических нарушениях обмена ЛП: семейной гомо- и гетерозиготной гиперхолестеринемии, семейной комбинированной гиперлипидемии, полигенной гиперхолестеринемии.

При ряде патологических состояний развивается вторичная гиперхолестеринемия. К таким процессам относят гипотиреоз, нефротический синдром, сахарный диабет и др. Гипохолестеринемия возникает при гипертиреозе, при тяжелых клинических ситуациях, сопровождающих разные нозологические формы заболеваний, при острой стадии воспалительного процесса, а также онкологических заболеваниях.

Методы определения холестерина в сыворотке

Методы определения холестерина в сыворотке крови многочисленны; можно выделить химические и ферментативные методы. В свою очередь среди химических методов выделяют прямые и непрямые (экстракционные) методы.

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА

Прямые методы. Основа прямых методов определения холестерина — реакция Либермана–Бурхарда, в которой холестерин взаимодействует со смесью серной и уксусной кислот, а также уксусного ангидрида. Реакция протекает в сильноокислой безводной среде. В ходе реакции молекула холестерина последовательно окисляется и образуется окрашенное соединение холестагексаен — серная кислота с максимумами абсорбции при 410 и 610 нм. Развивающаяся окраска неустойчива, поэтому следует точно выдерживать время фотометрирования. В литературе можно встретить разное соотношение ингредиентов в реактиве Либермана–Бурхарда; чем выше содержание уксусного ангидрида, тем с большей скоростью протекает реакция. Реак-

ция холестерина со смесью Либермана–Бурхарда неспецифична. В реакции прямого определения холестерина окраска реакционной смеси со стандартным раствором имеет изумрудный цвет; пробы сыворотки могут давать зеленый, голубой, бурый цвет. Это связано с тем, что в реакцию вступают многие компоненты сыворотки крови. Кроме того, в реакции Либермана–Бурхарда свободный холестерин и его эфиры формируют окрашенные комплексы с разным коэффициентом молярного поглощения: в случае эфиров холестерина оптическая плотность оказывается более высокой. Это изначально вносит ошибку в исследование, поскольку неизвестно отношение свободный холестерин/эфиры холестерина в каждой из проб.

Реакция Киллиани–Зака — другой распространенный метод определения холестерина (реакция холестерина с солями железа, уксусной и серной кислотами). Эта химическая реакция протекает в присутствии ионов трехвалентного железа с последовательным формированием в молекуле холестерина 2, 3 и 4 двойных сопряженных связей, при этом максимум поглощения образовавшихся соединений меняется от 420 до 563 нм. В реакции Киллиани–Зака свободный холестерин и его эфиры дают сходные цветные комплексы.

Непрямые методы. К непрямым методам относят приемы, когда липиды из сыворотки крови вначале экстрагируют органическими растворителями, а после упаривания проводят реакцию Либермана–Бурхарда. Такой метод более воспроизводим и точен, поскольку удается убрать интерферирующие вещества, остающиеся в водной фазе. Для экстракции используют системы этанол-диэтиловый эфир, этанол–ацетон, метанол–хлороформ; наиболее часто применяют гексан и изопропиловый спирт. Включение этапа экстракции повышает специфичность метода; результаты определения холестерина на 7% ниже, чем при прямом методе.

Референсные методы определения холестерина проходят 3 стадии; они включают экстракцию липидов в неполярный растворитель, омыление эфиров холестерина и повторную экстракцию холестерина из омыленной смеси. В качестве референсного метода наиболее предпочтителен метод Абелл–Кендалла, предложенный в 1952 г.: липидный экстракт омыляют спиртовым раствором гидроокиси калия и экстрагируют петролейным эфиром.

ром. Реакцию Либермана–Бурхарда проводят после упаривания петролейного эфира.

Трудности приготовления стандартных растворов холестерина связаны с его гидрофобностью. Длительное время в качестве стандартного раствора применяли раствор холестерина в ледяной уксусной кислоте. Далее в качестве стандартного был предложен раствор холестерина в изопропанол, однако, такой стандарт оказался неудобным при ферментативных методах определения холестерина, поскольку изопропанол активировал ферментные системы, завышая оптическую плотность. Для определения холестерина при работе с биохимическими анализаторами общепринято использование вторичных стандартов (калибраторов) — сывороток крови, уровень холестерина в которых определен референсными методами.

Несмотря на относительную простоту исполнения и дешевизну процедуры, химические методы токсичны, применение их на современных анализаторах связано с коррозией системы.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА

Преимущества ферментативного определения: проведение реакции в водной фазе; удобство автоматизации; высокая чувствительность и специфичность.

Ферментативное определение холестерина также включает несколько этапов: ферментативный гидролиз эфиров холестерина при действии холестеролэстеразы с образованием свободного холестерина и свободных жирных кислот; окисление холестерина кислородом, растворенным в реакционной среде при действии холестеролоксидазы с образованием холест-4-ен-3-ола и H_2O_2 . В наиболее широко используемых методах образующаяся перекись водорода окисляет некоторые соединения с образованием хромогенов, которые могут быть измерены фотометрически. К таким хромогенам могут быть отнесены 4-аминофеназон (максимум абсорбции 500–525 нм), а также образование гетероцикла Хенача в реакции с метанолом (максимум абсорбции 405 нм). Возможна регистрация образованной перекиси водорода в реакции с НАД-зависимыми дегидрогеназами и измерением оптической плотности при длине волны 340 нм.

Как и в химических методах, некоторые компоненты сыворотки крови холестерина могут оказывать влияние на результаты определения. Билирубин ингибирует реакцию пероксидазы с 4-аминоантипирином и фенолом. Восстановители сульфгидрильных групп (глутатион, цистеин, дитиотреитол) также оказывают влияние на результаты реакции. Методы, основанные на разных ферментативных реакциях, могут давать различные результаты.

Методические трудности ферментативного определения холестерина связаны с гетерогенностью распределения холестерина между ЛП, а также с его этерификацией в крови. Полнота гидролиза эфиров холестерина зависит от источника выделения фермента. Микробиальная холестеролэстераза более активно гидролизует эфиры холестерина, образованные насыщенными жирными кислотами, тогда как панкреатическая — полиненасыщенными жирными кислотами.

Взятие крови для определения всех липидов обычно проводят после 12–16 ч голодания. Концентрация холестерина в крови не меняется до и после приема пищи, однако выраженная опалесценция сыворотки крови, обусловленная наличием ХМ и ЛПОНП, может мешать определению. Желательно, чтобы в течение по меньшей мере 2 нед до взятия крови пациент не менял привычного питания. Для определения уровня холестерина можно использовать сыворотку или плазму крови. В качестве антикоагулянта для получения плазмы обычно используют сухую ЭДТА (1 мг/мл крови), которая обладает также антиоксидантными свойствами. Концентрация холестерина в сыворотке крови на 2–4% ниже, чем в плазме крови.

Система гемостаза — одна из защитных систем организма, обеспечивающая сохранение крови в жидком состоянии в пределах кровеносных сосудов и образование тромбов в области повреждения стенки сосудов. Гемостатический процесс включает 5 стадий: локальную вазоконстрикцию, формирование тромбоцитарного тромба, стабилизацию его фибрином, ретракцию тромба и его растворение после восстановления поврежденной стенки сосуда. Свертывание крови обеспечивается взаимодействием белков плазмы и клеток крови с поврежденным эндотелием или субэндотелиальными структурами. Условно система гемостаза подразделяется на 3 системы: свертывания, противосвертывания и фибринолиза, которые тесно взаимосвязаны, а их разделение необходимо лишь для удобства изложения материала.

2.1. КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ

Основные компоненты системы свертывания крови были идентифицированы к середине 50-х годов (табл. 2.1). Большинство факторов свертывания были открыты при исследовании крови больных с нарушениями свертываемости, их называли по фамилиям больных или по предполагаемому характеру выполняемой функции. Кроме этого, ряд факторов был открыт практически одновременно в разных лабораториях, они получали разные названия, что затрудняло систематизацию данных. В 1957 г. Международный комитет по номенклатуре факторов свертывания крови ввел цифровые обозначения факторов. Порядковый номер факторам присваивали примерно в той последовательности, в которой они были открыты. Плазменные факторы свертывания

были пронумерованы римскими цифрами, а тромбоцитарные — арабскими. Активированные формы факторов обозначаются добавлением к цифре буквы а. Факторам Флетчера и Фитцджеральда—Вильямса—Фложак цифровые обозначения не были присвоены, так как вскоре после обнаружения этих факторов было установлено, что это соответственно плазменные прекалликреин и высокомолекулярный кининоген.

ФАКТОРЫ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

В активированной форме 6 плазменных факторов системы свертывания крови и калликреин — специализированные сериновые протеазы. Соответственно основной механизм активации свертывания крови — ограниченный протеолиз. Протеазные домены происходят из С-концевых частей молекул проферментов. Аминокислотные последовательности этих участков факторов свертывания крови гомологичны таковым трипсина и химотрипсина. Селективность действия протеаз системы гемостаза обеспечивается специфическими структурами N-концевых частей молекул.

Gla-домены. В N-концевой части протромбина, факторов X, IX и VII, а также протеинов C и S содержится до 12 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla), образующейся в результате посттрансляционного γ -карбоксилирования остатков Glu под действием карбоксилазы и витамин K-эпоксидредуктазы (рис. 2.1). Эти остатки связывают ионы Ca^{2+} , что стабилизирует структуру белков и необходимо для эффективного взаимодействия факторов с фосфолипидами. При дефиците витамина K или приеме его антагонистов степень γ -карбоксилирования снижается и гепатоциты секретируют факторы, обладающие низкой функциональной активностью. Их называют PIVKA-белками, индуцированными антагонистами витамина K.

Крингл-домены. Протромбин, фактор XII и ферменты системы фибринолиза содержат участки, состоящие из ~ 80 аминокислотных остатков, которые образуют петлю, свернутую в форме сплюснутого бублика. В стабилизации структуры важная роль принадлежит 3 дисульфидным мостикам и боковым цепям аминокислот, образующих внутреннюю, наиболее консервативную

Таблица 2.1. Факторы системы свертывания крови

Название	Молекулярная масса, кД	Среднее содержание в плазме, мг/л	Время полужизни	Функция
Фибриноген (фактор I) Аα-цепь Вβ-цепь γ-цепь	340 67 52 47	3000	3 дня	Структурный белок
Протромбин (фактор II)	72	100	4–5 дней	Профермент
Тканевый фактор (фактор III)	37	Следы		Кофактор, активатор
Фактор V (проакцелерин)	330	10	25 ч	Кофактор
Фактор VII (проконвертин)	50	0,5	5 ч	Профермент
Фактор VIII (антигемофильный фактор A, VIII:C)	330	0,1	10 ч	Кофактор
Фактор IX (антигемофильный фактор B, фактор Кристмаса)	56	5	20 ч	Профермент
Фактор X (фактор Стюарта–Прауэр)	56	10	3 дня	Профермент
Фактор XI	160	5	3 дня	Профермент
Фактор XII (фактор Хагемана)	80	30	3 дня	Профермент
Фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор)	150 (тромбоцитарный) 320 (плазменный)	10	12 дней	Профермент трансглутаминазы
Плазменный прекалликреин	86	50		Фактор контактной активации
Высокомолекулярный кининоген	110	70		Фактор контактной активации

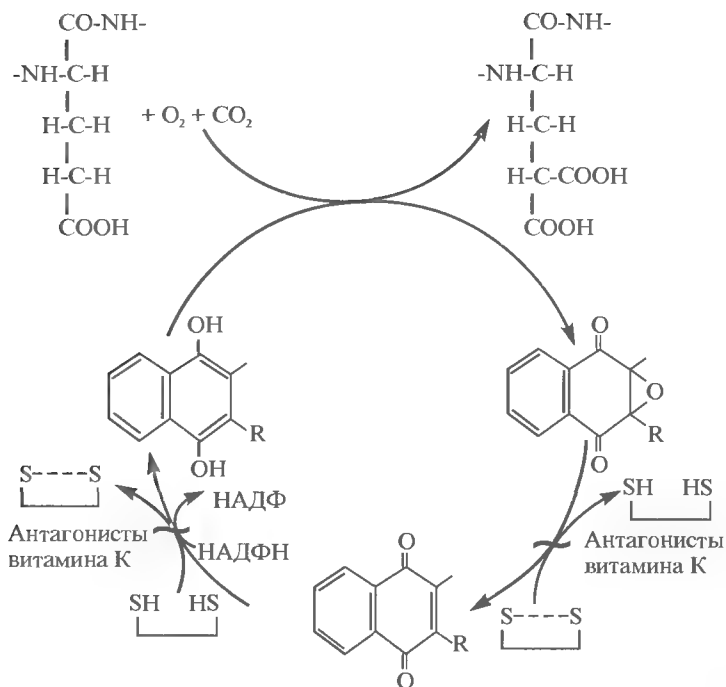


Рис. 2.1. Витамин К-зависимое образование γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Антагонисты витамина К (пероральные антикоагулянты) ингибируют восстановление эпоксидной и хиноновой форм витамина К, образующихся в ходе реакции карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты.

часть петли. Значительная вариабельность участков, образующих наружную часть петли, обеспечивает специфичность взаимодействия с другими компонентами системы гемостаза.

EGF-домены. Факторы VII, X, IX и XII содержат последовательность из ~50 аминокислот, гомологичную таковой фактора роста эпидермиса. EGF-домены обеспечивают связывание факторов со специфическими рецепторами на поверхности клеток или рецепторными доменами факторов V и VIII.

Последовательность ароматических аминокислот. Протромбин, факторы VII, X и IX содержат 5-членную последовательность Phe-Trp-X-X-Tyr, в которой ароматические боковые цепи аминокислот экспонированы наружу, что создает гидрофобный участок, взаимодействующий с мембранами клеток.

Домены фибронектина. Фактор XII содержит 2 участка, гомологичных фрагментам фибронектина типа I и II. Предполагается, что фрагмент типа II фибронектина принимает участие во взаимодействии с коллагеном.

Фактор XIII представлен 2 формами: плазменной и тромбоцитарной. Плазменная форма — тетрамер, состоящий из 2 пар цепей (α и β), тромбоцитарная содержит только α -цепи. Активация плазменной формы фактора XIII протекает в 2 этапа. Вначале под действием тромбина или фактора X_a происходит расщепление α -цепей с освобождением пептида активации, затем тетрамер распадается с образованием активного фермента, состоящего из 2 α' -цепей.

Фактор XIII_a катализирует образование ϵ -(γ -глутамил)-лизиновых ковалентных связей между полипептидами в комплексах белков (рис. 2.2). Под действием фактора XIII_a происходят сшивание смежных молекул фибрин-мономеров в полимере, а также сшивание с фибрином α_2 -антиплазмина, коллагена и фибронектина.

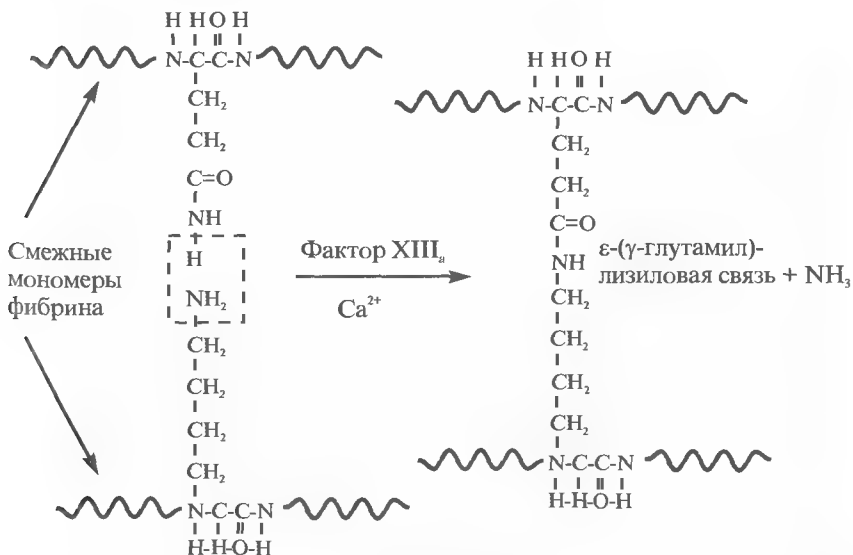


Рис. 2.2. Образование ковалентных связей между боковыми цепями остатков глутамина и лизина смежных молекул фибрин-мономеров в полимере.

БЕЛКИ-РЕГУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Факторы V и VIII — гомологичные белки, выполняющие в свертывании крови сходную роль. Они обеспечивают связывание витамин К-зависимых факторов IX_a и X_a и их субстратов — факторов X и протромбина — с фосфолипидами. Наличие множественных связей в этих комплексах обеспечивает эффективное взаимодействие ферментов с субстратами и увеличение эффективности реакций активации в сотни тысяч раз.

Факторы V и VIII синтезируются как полипептиды, состоящие соответственно из 2196 и 2332 аминокислотных остатков. Оба белка содержат по 3 А-домена, гомологичных церулоплазмину, по 2 гомологичных С-домена и большой центральный В-домен, который отщепляется при активации факторов. Фактор VIII легко подвергается протеолизу в С-концевой области В-домена и в плазме обнаруживается в виде набора гетеродимеров, взаимодействующих при участии Ca²⁺. Активируются факторы V и VIII под действием тромбина или фактора X_a. Тромбин расщепляет фактор V по остаткам Arg в положениях 709, 1018 и 1545, а фактор VIII по остаткам Arg 372, 740 и 1689. В активированной форме фактор V — гетеродимер (A1-A2/A3-C1-C2), а фактор VIII — гетеротример (A1/A2/A3-C1-C2), субъединицы которых взаимодействуют при участии ионов Ca²⁺. Участки связывания активированных факторов V и VIII с фосфолипидами находятся во фрагментах, происходящих из С-концевых частей исходных молекул.

В плазме фактор VIII циркулирует в виде комплекса с фактором фон Виллебранда (фФВ) — адгезивным белком, обеспечивающим связывание тромбоцитов с субэндотелиальными структурами и склеивание тромбоцитов при их агрегации. Другая функция фФВ — повышение стабильности фактора VIII и защита его от инактивации протеином С. фФВ синтезируется только в мегакариocyтах и клетках эндотелия как полипептид, состоящий из 2050 аминокислотных остатков, который вначале димеризуется, а затем мультимеризуется с образованием комплексов, достигающих молекулярной массы 20000 кД. Димеры фФВ постоянно секретируются в плазму. Мультимеры находятся

в α -гранулах тромбоцитов и тельцах Вайбеля–Паладе эндотелия и секретируются из них при активации тромбоцитов или повреждении эндотелия. Мультимерам фФВ принадлежит ведущая роль в адгезии тромбоцитов и образовании тромбоцитарных агрегатов в условиях высокого напряжения сдвига, которое характерно для мелких сосудов и стенозированных участков артерий.

Тканевый фактор (ТФ) — трансмембранный гликопротеин, выполняющий функции рецептора фактора VII и модулятора его активности. Кофакторная активность тканевого фактора определяется как апобелком, так и фосфолипидами мембраны клеток. Связывание одноцепочечной формы фактора VII с ТФ изменяет структуру фактора VII таким образом, что становится возможным его расщепление на двухцепочечную форму, которая в комплексе с ТФ активирует факторы свертывания крови X и IX, что инициирует каскад реакций гемокоагуляции. ТФ — конститутивный компонент мембран ряда типов клеток, в норме не контактирующих с плазмой крови. Высокое содержание ТФ характерно для коры головного мозга, миокарда, клеток эпидермиса и эпителия, выстилающего слизистые оболочки органов. Клетки эндотелия и моноциты могут экспрессировать ТФ под воздействием медиаторов воспаления, эндотоксина, окисленных липопротеинов низкой плотности и иммунных комплексов, что может быть одной из причин активации внутрисосудистого свертывания крови при ряде заболеваний.

ТФ состоит из 263 аминокислотных остатков; это отдаленный представитель суперсемейства белков, включающего рецепторы гормона роста, ИЛ-1-7 и ИФН (α и β). Исследования последних лет показали, что функция ТФ не ограничивается только активацией свертывания крови. Связывание фактора VII_a с ТФ вызывает Ca^{2+} -сигналы в клетках, стимулирует миграцию ГМК, рост и метастазирование опухолей. В эмбриогенезе экспрессия ТФ начинается раньше, чем экспрессия фактора VII. Селективное повреждение гена ТФ приводит к аномалиям в развитии кровеносных сосудов и гибели эмбрионов мышей.

ФИБРИНОГЕН

Фибриноген состоит из 3 пар неидентичных полипептидных цепей, обозначаемых как A α , B β и γ ; его молекула симметрична,

вытянута, слегка изогнута и имеет размер 7×48 нм. Основные черты пространственной организации молекулы фибриногена как структуры, состоящей из 3 модулей, были определены Холлом и Слейтером в 1959 г. с помощью электронной микроскопии. N-концевые части всех 3 полипептидов образуют центральную область взаимодействия 2 половин молекулы фибриногена (Е-домен), которые ковалентно связаны между собой 3 дисульфидными мостиками. Далее следует область, в которой все 3 субъединицы закручены в суперспираль длиной ~ 16 нм. Примерно посередине суперспирали имеется короткая область нарушения регулярности структуры. Она служит одним из участков специфического расщепления плазмином. За суперспиралью каждая из полипептидных цепей фибриногена образует свою структуру. С-концевые фрагменты β - и γ -цепей образуют на концах молекулы фибриногена глобулы, которые латерально смещены от оси суперспирали (D-домен). После спирального участка α -цепи загибаются, и их С-концевые участки взаимодействуют друг с другом вблизи центра молекулы (рис. 2.3).

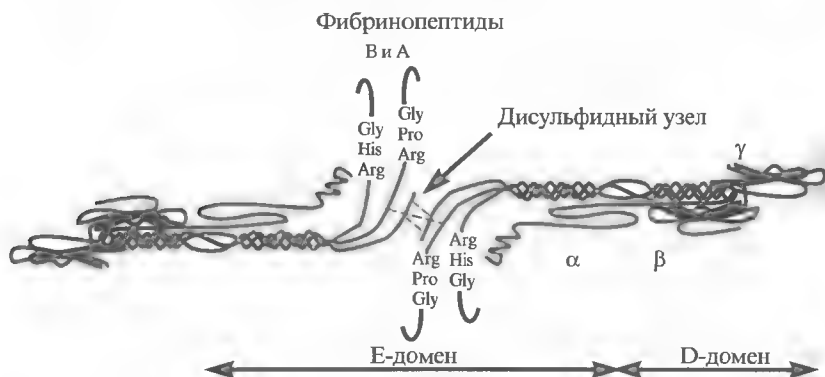


Рис. 2.3. Структура фибриногена.

В агрегации тромбоцитов фибриноген выполняет роль мостиков, связывающих между собой активированные клетки. При активации на поверхности тромбоцитов открываются специфические рецепторы, состоящие из гликопротеинов $\text{II}_b\text{--III}_a$, взаимодействующих с аминокислотными последовательностями RGD и HNLGGAKQAGDV, имеющиеся в С-концевых областях α -цепи

(остатки 572–574) и γ -цепи (остатки 400–411) фибриногена. Данные о значении остатков 572–574 в связывании с тромбоцитами противоречивы. По-видимому, ведущая роль во взаимодействии с тромбоцитами принадлежит γ -цепям фибриногена.

Полимеризация фибриногена начинается после того, как в результате отщепления тромбином N-концевого 16-членного фибринопептида А в α -цепи открывается участок Gly-Pro-Arg, взаимодействующий с комплементарным участком в С-концевой части γ -цепи. Этого достаточно для того, чтобы инициировать процесс самосборки протофибрилл, в которых периферический D-домен одной молекулы взаимодействует с центральным Е-доменом другой молекулы (рис. 2.4). Отщепление от N-конца В β -цепи 14-членного фибринопептида В и экспозиция дополнительного участка взаимодействия, содержащего последовательность Gly-His-Arg, значительно ускоряют процесс сборки и латеральную ассоциацию протофибрилл с образованием больших узлов фибриновых волокон. Ветвление волокон с образованием трехмерной фибриновой сетки происходит с участием С-концевых доменов α -цепей и служит необходимым этапом формирования прочного геля. Механическая стабильность фибрина и его устойчивость к лизису повышаются, когда под действием фактора XIII_a образуются ковалентные связи между смежными мономерами фибрина в полимере. Вначале между собой попарно сшиваются γ -цепи, а затем сшиваются α -цепи фибриногена с образованием длинных полимеров.

Последовательность каждой из цепей фибриногена кодируется соответствующим геном, однако их значительная гомология свидетельствует о том, что возникли они в результате дупликации одного гена-предшественника. Экспрессия 3 генов фибриногена координируется, а сборка белка начинается с В β -цепи. А α -и В β -цепи фибриногена состоят из 610 и 461 аминокислотных остатков соответственно. γ -Цепь фибриногена имеет 2 варианта. В плазме кроме основной формы, состоящей из 411 остатков, присутствует минорная (~10%) форма, в которой в результате альтернативного сплайсинга С-концевой тетрапептид заменен 20-членным пептидом. Фибриноген, содержащий удлиненную γ' -цепь, менее эффективно взаимодействует с тромбоцитами. Обнаружены полиморфные участки в А α -цепи — Thr/Ala₃₁₂ и в

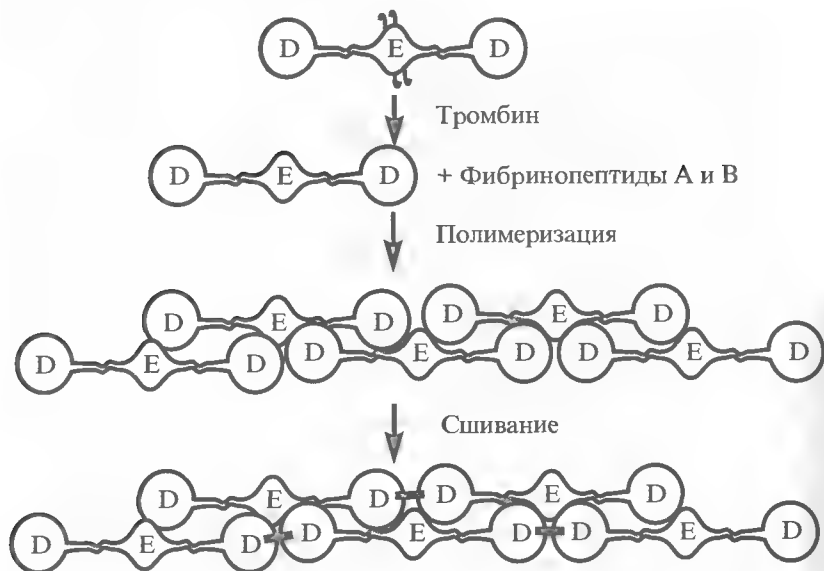


Рис. 2.4. Схема взаимодействия молекул фибрин-мономеров в процессе полимеризации и сшивания.

В β -цепи — Arg/Lys₄₄₈. У мужчин, гомозиготных по Arg₄₄₈, уровень фибриногена в крови ниже, чем у гетерозиготных и гомозиготных по Lys₄₄₈. Обнаружен полиморфизм и в промоторной области В β -гена, контролируемой ИЛ-6. Это свидетельствует о том, что уровень фибриногена частично определяется генетически. Кроме этого, различные варианты фибриногена могут различаться по их роли в патогенезе атеротромбоза.

Фибриноген подвергается множественной посттрансляционной модификации, заключающейся в гликозилировании, фосфорилировании, сульфатировании Туг_{418,422} минорных γ' -цепей и гидроксिलировании Рго₃₁ В β -цепей, что значительно увеличивает число возможных вариантов этого белка в организме.

В А α -цепи фибриногена обнаружено 2 участка фосфорилирования — Ser₃ и Ser₃₄₅. Физиологическое значение фосфорилирования Ser₃, который находится в фибринопептиде А, неизвестно. Фосфорилирование по этому участку не влияет на скорость отщепления фибринопептида А *in vitro*. Другой участок фосфо-

рилирования находится вблизи области, участвующей во взаимодействии молекул при полимеризации и сшивании. По данным экспериментов *in vitro*, степень фосфорилирования этого участка влияет на структуру фибринового геля. Дефосфорилированный белок образует более толстые нити при полимеризации. Степень фосфорилирования возрастает в условиях, когда стимулируется синтез фибриногена. Это может свидетельствовать о том, что исходно фибриноген секретируется в фосфорилированной форме и постепенно дефосфорилируется фосфатазой крови. Фосфорилированный фибриноген более устойчив к протеолизу, чем дефосфорилированный.

Фибриноген связывает 3 иона Ca^{2+} с высоким ($K_d \sim 1 \mu\text{M}$) и около 10 с низким ($K_d \sim 1 \text{ mM}$) сродством. Участки высокого сродства, гомологичные Ca^{2+} -связывающим центрам кальмодулина, находятся в С-концевой области γ -цепи фибриногена. Аминокислотные замены в этой области приводят к нарушению полимеризации фибрина. С низким сродством Ca^{2+} связывается остатками сиаловых кислот.

Молекула фибриногена содержит 4 раздваивающиеся углеводные цепи, образующие N-гликозидную связь с Asn_{52} и Asp_{364} γ - и β -цепей соответственно. На концах углеводных цепей могут находиться остатки сиаловых кислот, играющие важную роль в полимеризации фибрина. При отщеплении сиаловых кислот скорость полимеризации фибрина увеличивается, а удаление всех углеводных компонентов устраняет влияние Ca^{2+} на полимеризацию и приводит к увеличению латеральной агрегации фибриновых нитей. Увеличение содержания сиаловых кислот при заболеваниях, сопровождающихся повышением активности сиалилтрансферазы, — одна из причин приобретенной дисфибриногенемии.

Дисфибриногенемия характеризуется тем, что содержание белка в плазме может быть близким к норме, но некоторые из его функций нарушены. Дефектные фибриногены обозначают по наименованию города, в котором они впервые были обнаружены. К настоящему времени описано более 80 вариантов аминокислотных замен, которые влияют на отщепление фибринопептидов, полимеризацию, взаимодействие с тромбоцитами и эритроцитами, сшивание и разрушение фибрина.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ФИБРИНОГЕНА

Фибриноген — белок острой фазы; его уровень в плазме может значительно повышаться при многих заболеваниях. Синтез фибриногена стимулируется ИЛ-6. Концентрация фибриногена повышается с возрастом, при нарушениях метаболизма (например, при гиперлипидемии), курении и приеме пероральных контрацептивов. Для фибриногена характерны сезонные изменения концентрации с максимумом в зимние и минимумом в летние месяцы.

В проспективных исследованиях показано, что с повышением уровня фибриногена увеличивается риск заболеваний ССС. Хотя уровень фибриногена коррелирует с многими известными факторами риска заболеваний ССС, данные ряда проспективных исследований свидетельствуют о том, что фибриноген может рассматриваться как независимый фактор риска, значимость которого увеличивается при сочетании с гиперхолестеринемией и повышением систолического АД. Значимость фибриногена в патогенезе заболеваний ССС может быть обусловлена тем, что этот белок определяет вязкость плазмы крови, повышает агрегацию тромбоцитов и эритроцитов. Фибриноген накапливается в области атеросклеротических бляшек, где после превращения в фибрин стабилизирует тромбоцитарные агрегаты. Фибрин и продукты его разрушения стимулируют пролиферацию ГМК и моноцитов, обеспечивая матрикс для роста клеток и связывая тромбин, обладающий митогенной активностью.

АКТИВАЦИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Свертывание крови происходит в результате серии реакций, в которых путем ограниченного протеолиза образуются активные формы компонентов системы. Многоступенчатость и ферментативная природа реакций активации обеспечивают возможность резкого усиления начального сигнала и эффективного контроля процесса свертывания крови, который должен протекать локально в области повреждения стенки сосуда. В основе современной

схемы механизма активации свертывания крови лежит каскад последовательных реакций.

Два типа взаимодействий могут приводить к инициации свертывания крови, и каскад реакций гемокоагуляции принято представлять в виде двух возможных путей активации — внутреннего и внешнего (рис. 2.5). Внешний путь получил такое название, поскольку для его инициации необходим тканевый фактор (тромбопластин), который в норме в крови и клетках, контактирующих с кровью, отсутствует и появляется при повреждении ткани. Внутренний путь, все компоненты которого присутствуют в крови, начинается с контактной активации фактора XII и прекалликреина.

Внутренний путь

Связывание фактора XII с компонентами субэндотелиального слоя, активированными тромбоцитами, мицеллами фосфолипидов или бактериальными липополисахаридами изменяет его конформацию таким образом, что он становится высокочувствительным к протеолитической активации калликреином; в комплексе с высокомолекулярным кининогеном повышает активацию прекалликреина, который затем может обеспечить дополнительную активацию фактора XII.

Начальный этап активации фактора XII — расщепление по остатку Arg₃₅₃ с образованием фермента, состоящего из 2 полипептидных цепей, соединенных дисульфидным мостиком. Протеазной активностью обладает легкая цепь, а тяжелая цепь содержит домены, обеспечивающие взаимодействие с другими компонентами. Калликреин плазмы может далее расщеплять еще 2 связи по остаткам Arg₃₃₄ и Arg₃₄₃, что приводит к образованию β-формы фактора XII_a, которая обладает ферментативной активностью, но в результате потери основной массы тяжелой цепи не способна взаимодействовать с поверхностью и активировать фактор XI.

Детали контактной активации свертывания крови и ее физиологическое значение не выяснены. Наследственный дефицит фактора XII, прекалликреина или высокомолекулярного кининогена не проявляется повышенной кровоточивостью у больных.

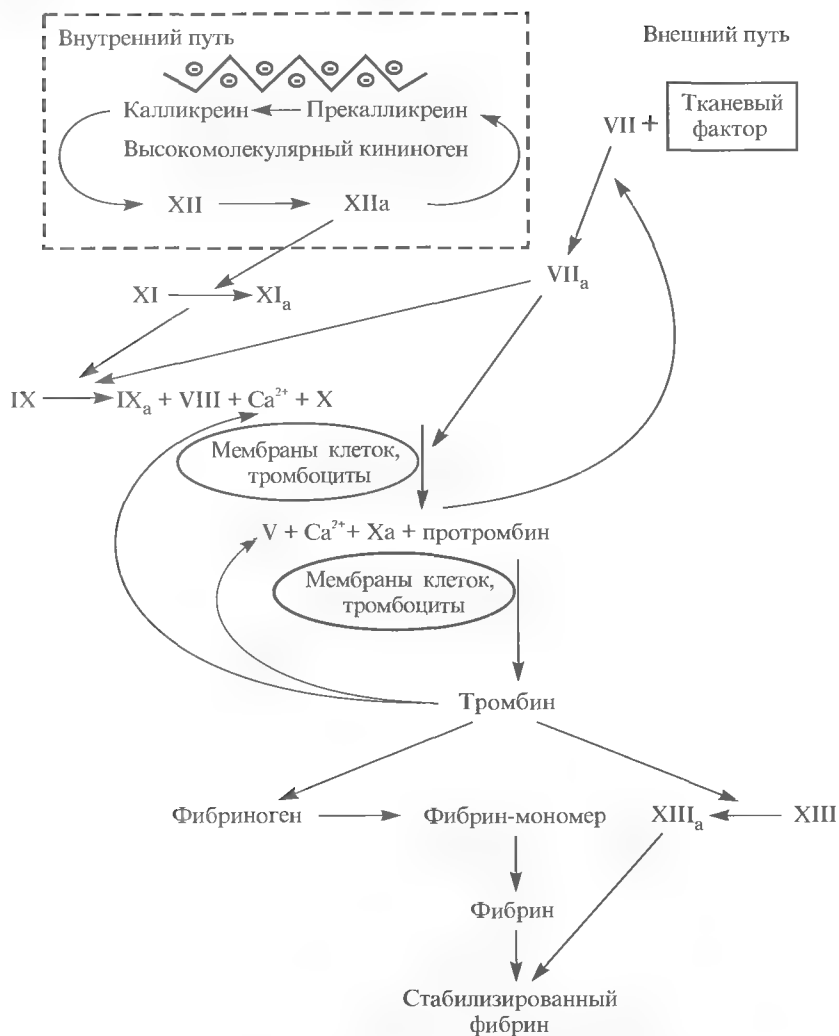


Рис. 2.5. Схема основных реакций активации свертывания крови.

На следующей стадии фактор XII_a активизирует фактор XI, структура которого имеет много общего со структурой прекалликреина. Высокомолекулярный кининоген служит кофактором активации фактора XI, протекающей на поверхности. Расщепление связи Arg₃₆₉-Ile₃₇₀ в каждой из субъединиц приводит

к образованию фермента, состоящего из 2 легких и 2 тяжелых цепей, соединенных дисульфидными мостиками. Тяжелые цепи содержат участки, обеспечивающие взаимодействие с высокомолекулярным кининогеном, и необходимы для Ca^{2+} -зависимой активации фактора IX.

Активация фактора IX происходит в результате последовательного расщепления 2 пептидных связей $\text{Arg}_{145}\text{--Ala}_{146}$ и $\text{Arg}_{180}\text{--Val}_{181}$ с высвобождением пептида активации и может протекать под действием как фактора XI_a , так и комплекса фактора VII с тканевым фактором в присутствии Ca^{2+} . Исследование кинетики реакции активации фактора IX под действием фактора XI_a или комплекса тканевый фактор–фактор VII_a показало, что оба пути активации примерно одинаково эффективны. Нормальный уровень пептида активации фактора IX у больных с дефицитом фактора XI и сниженный уровень при дефиците фактора VII свидетельствуют в пользу того, что по крайней мере стационарная активация фактора IX протекает под действием фактора VII_a . О физиологической значимости активации фактора IX фактором VII_a свидетельствует также и то, что симптомы кровоточивости у больных с дефицитом фактора XI менее выражены, чем у больных с дефицитом факторов IX или VIII.

Активация фактора X под действием фактора IX_a протекает на поверхности фосфолипидов при участии ионов Ca^{2+} и фактора VIII_a , выполняющего роль матрицы, обеспечивающей связывание и оптимальное взаимодействие факторов IX_a и X, что увеличивает скорость реакции в сотни тысяч раз. Фактор X состоит из 2 цепочек, образующихся в результате расщепления связей $\text{Arg}_{139}\text{--Arg}_{140}$ и/или $\text{Arg}_{142}\text{--Ser}_{143}$ и соединенных дисульфидным мостиком. Активация фактора X происходит после расщепления связи $\text{Arg}_{194}\text{--Ile}_{195}$ в N-концевой части тяжелой цепи с освобождением пептида активации. Другой физиологически важный активатор фактора X — комплекс тканевый фактор–фактор VII_a .

Внешний путь

При контакте крови с клетками, экспрессирующими тканевый фактор, фактор VII плазмы связывается с высоким сродством ($K_d \sim 3 \text{ нМ}$) с тканевым фактором. Образование комплекса резко

увеличивает чувствительность фактора VII к протеолитической активации, заключающейся в расщеплении связи Arg₁₅₂-Ile₁₅₃. Активация может происходить под действием следов активных форм факторов X и IX, а также в результате аутоактивации. В плазме около 1% фактора VII постоянно находится в двухцепочечной форме, которая в отсутствие тканевого фактора не ингибируется антитромбином III и не может активировать свои естественные субстраты — факторы X и IX.

Фактор VII может активироваться и под действием фактора XII_a. Данная реакция вряд ли играет существенную роль в обеспечении гемостаза в норме, но она может лежать в основе холодовой активации фактора VII при хранении плазмы при 4 °C. Эту возможность необходимо учитывать при подготовке образцов для исследования функциональной активности фактора VII.

ОБРАЗОВАНИЕ ТРОМБИНА

Фактор X, активированный на поверхности фосфолипидов комплексом фактор IX_a-VIII_a или комплексом фактор VII_a-тканевый фактор, формирует комплекс с фактором V и протромбином. Тромбин образуется в результате последовательного расщепления 2 связей в молекуле протромбина. После гидролиза связи Arg₃₂₀-Ile₃₂₁ образуется мейзотромбин, в котором 2 половины исходной молекулы связаны дисульфидным мостиком. Мейзотромбин обладает протеолитической активностью, сходной с тромбином в активации ПрС и служит мощным вазоконстриктором, но не обладает прокоагулянтными активностями тромбина и не инактивируется антитромбином III. После гидролиза связи Arg₂₇₁-Thr₂₇₂ из комплекса высвобождаются N-концевой фрагмент активации протромбина 1 + 2, содержащий все регуляторные домены, и молекула α-тромбина, состоящая из 2 цепочек, соединенных дисульфидным мостиком. Активный центр и субстратсвязывающий участок находятся в В-цепи, состоящей из 259 аминокислотных остатков. А-цепь исходно состоит из 49 аминокислотных остатков, но в тромбине человека от ее N-конца может дополнительно отщепляться 13-членный пептид без существенного изменения ферментативных свойств.

В-цепь α -тромбина человека легко подвергается аутолизу. Наиболее чувствительные связи Lys₁₅₄–Gly₁₅₅, Arg₇₀–Tyr₇₁ и Arg₇₃–Asn₇₄. В результате их расщепления разрушается структура участков, обеспечивающих взаимодействие тромбина с макромолекулярными субстратами. Образующиеся при этом β -, β' - и γ -тромбины обладают сходной с α -тромбином активностью в отношении низкомолекулярных субстратов, но значительно меньшей (< 1% от исходной) свертывающей активностью.

После образования тромбин диссоциирует из протромбинного комплекса и может участвовать в регуляции многих физиологических процессов. Наиболее известные функции тромбина прокоагулянтная, антикоагулянтная, вазоактивная и митогенная. На завершающей стадии свертывания крови тромбин обеспечивает превращение фибриногена в фибрин и активирует фактор XIII, стабилизирующий фибрин. Кроме этого, тромбин оказывает прокоагулянтное действие, активируя свое образование.

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ОБРАТНЫЕ СВЯЗИ

Положительные обратные связи (см. рис. 2.5) имеют очень важное значение в инициации свертывания крови. Их наличие обеспечивает возможность преодоления ингибиторного потенциала крови и образования тромбина в количестве, достаточном для активации тромбоцитов и образования фибрина. Тромбин может ускорять свое образование, активируя тромбоциты, факторы V и VIII, а также, возможно, факторы VII и XI.

Тромбин — наиболее мощный из известных активаторов тромбоцитов, этот путь активации тромбоцитов служит ведущим механизмом образования артериальных тромбов. Активация осуществляется через специфический рецептор, принадлежащий к семейству рецепторов, содержащих 7 трансмембранных доменов, и заключается в отщеплении тромбином N-концевого пептида от внеклеточного участка рецептора. Открывающийся при этом новый N-концевой участок служит связанным лигандом, который активирует рецептор. Согласно этому механизму тромбин в отличие от других агонистов действует каталитически и одна молекула тромбина может активировать много рецепторов.

В 2 ключевых реакциях свертывания крови важную роль играют факторы V_a и $VIII_a$, обеспечивающие образование на поверхности фосфолипидов комплексов, в которых каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m) реакций активации фактора X и протромбина увеличивается в сотни тысяч раз. Способность к образованию фосфолипидзависимых комплексов с соответствующими ферментами и субстратами у факторов V и $VIII$ появляется после активации тромбином, заключающейся в расщеплении как минимум 3 связей. Активация фактора $VIII$ необходима также для его диссоциации из комплекса с фФВ. Происходит это после расщепления по Arg_{1689} , находящемуся в области участка взаимодействия с фФВ. Кроме тромбина, эти факторы могут активироваться и под действием фактора X_a , но активация протекает с меньшей скоростью и фактор X_a не может активировать фактор $VIII$, находящийся в комплексе с фФВ.

Основная положительная обратная реакция факторов X_a и IX_a — активация фактора VII .

ФУНКЦИЯ ФОСФОЛИПИДОВ

Наличие многоступенчатого каскада ферментативных реакций может обеспечить значительное усиление начального стимула, необходимое для быстрого тромбирования поврежденных участков сосудов, по которым под давлением и с высокой скоростью циркулирует кровь. В то же время свертывание крови должно быть ограничено участком повреждения стенки сосуда. Один из механизмов ограничения — локализация активации свертывания на поверхности поврежденных или стимулированных клеток. Причем необходимо участие клеток, экспрессирующих тканевый фактор, и активированных тромбоцитов, на поверхности которых могут протекать зависимые от прокоагулянтных фосфолипидов реакции активации свертывания крови.

Для мембран клеток характерно асимметричное распределение фосфолипидов. Наружный слой мембраны формируется преимущественно из холиновых фосфолипидов, а обладающие прокоагулянтными свойствами аминифосфолипиды фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин находятся на цитоплазматической стороне мембраны. Асимметричное распределение фосфолипидов

поддерживается АТФ-зависимыми транслоказой, перемещающей аминокислоты с наружной стороны мембраны на внутреннюю, и флоппазой, осуществляющей медленный транспорт аминокислот и холиновых фосфолипидов с внутреннего на наружный слой мембраны. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ингибирует транслоказу, активирует скремблазу, осуществляющую перераспределение фосфолипидов, и калпаин, участвующий в формировании и отшнуровывании микровезикул, содержащих фосфатидилсерин.

2.2. СИСТЕМА ПРОТИВОСВЕРТЫВАНИЯ

С фосфолипидами связано антикоагулянтное действие аннексина V. Этот белок впервые был выделен из сосудов пуповины, а затем — и из плаценты и назван соответственно сосудистым и плацентарным антикоагулянтом. Содержание аннексина V в плазме очень низкое (~ 5 нг/мл), но этот белок может секретироваться из эндотелиальных клеток и оказывать локальное антикоагулянтное действие, заключающееся в конкурентном ингибировании связывания фактора X (X_a) с фосфолипидами.

ИНГИБИТОРЫ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ

Большинство компонентов системы гемостаза в активированной форме — сериновые протеазы. В регуляции их активности играют важную роль белки — ингибиторы протеаз (табл. 2.2). Все они, за исключением ингибитора пути тканевого фактора (ИПТФ) и α_2 -макроглобулина, — представители одного семейства, получившего название «серпины», которое образовалось в ходе эволюции из одного белка-предшественника параллельно с возникновением специализированных протеаз. Название — аббревиатура английского термина (от англ. *serpins*, *serine protease inhibitors* — ингибиторы сериновых протеаз). Кроме ингибиторов, в это семейство входят такие белки, как овальбумин, ангиотензиноген и тироксинсвязывающий глобулин. Серпины состоят из ~ 400 аминокислотных остатков, а различия молекулярной массы в основном обусловлены различной степенью гликозилирования. Гомология наиболее выражена в С-концевой области, содержа-

щей реактивный центр (участок, взаимодействующий с активным центром фермента), и наименее выражена в N-концевой области, легко подвергающейся протеолизу. Расщепление связей в N-концевом участке серпинов играет важную физиологическую роль. В случае ангиотензиногена это приводит к высвобождению ангиотензина, а в случае антитромбина III — к изменению его гепаринсвязывающих свойств.

Механизм действия серпинов состоит в образовании стехиометрического комплекса с протеазой, в котором после расщепления по реактивному центру ингибитор остается ковалентно связанным с серином активного центра фермента. Комплекс протеаза–ингибитор выводится из кровотока и разрушается. Таким образом, серпины — белки, выполняющие свою функцию один раз в жизни.

Исследования, выполненные *in vitro*, показали, что в близких к физиологическим условиям комплекс протеаза–ингибитор может диссоциировать, но с очень низкой скоростью ($t_{1/2}$ около 3 дней), возрастающей при повышении pH или под действием нуклеофильных реагентов. При этом высвобождаются активный фермент и ингибитор, расщепленный в C-концевой области.

Рентгеноструктурные исследования кристаллов α_1 -антитрипсина показали, что пептидная связь реактивного центра находится в напряженном интермедиатном состоянии. Это обеспечивает эффективное взаимодействие с активным центром протеазы и в то же время высокую чувствительность серпинов к инактивации путем окисления остатков Met вблизи реактивного центра или протеолитического расщепления петли, содержащей реактивный центр. Локальная инактивация серпинов путем окисления и расщепления эластазой может способствовать ограничению участков воспаления, а системная инактивация может быть одним из механизмов развития ДВС-синдрома при сепсисе или змеиных укусах.

АНТИТРОМБИН III

Антитромбин III — один из наиболее подробно исследованных ингибиторов плазмы крови. Он может ингибировать все протеазы системы свертывания крови, а также плазмин, трипсин

Таблица 2.2. Белковые ингибиторы протеаз крови

Название	Среднее содержание, мкг/мл	Молекулярная масса, кД	Реактивный центр	Ингибируемые ферменты
Антитромбин III	150	58	Arg-Ser	Тромбин и протеазы внутреннего пути свертывания
Кофактор гепарина II	70	66	Leu-Ser	Тромбин
α_2 -Антиплазмин	—	70	Arg-Met	Плазмин
Ингибиторы активатора Пг типа I и II	—	50–70	Arg-Met Arg-Thr	Тканевый активатор Тканевый активатор, урокиназа
Ингибитор ПрС	6	63	Arg-Ser	ПрС, активаторы Пг
α_1 -Антитрипсин	700	51	Met-Ser	Эластаза
α_1 -Антихимотрипсин	500	69	Leu-Ser	Катепсин G
C1-инактиватор	200	104	Arg-Thr	Система комплемента, калликреин
Протеазный нексин-I	Следы	43	Arg-Ser	Тромбин, тканевый активатор, урокиназа
α_2 -Макроглобулин	—	4 · 160	—	Многочисленный ингибитор
Ингибитор пути тканевого фактора	0,1	43	Lys-Ala Arg-Gly	Комплекс VII _a +X _a

и $C1_s$ -компонент системы комплемента. Концентрация антитромбина III в плазме составляет 0,15–0,18 мг/мл, а $t_{1/2}$ — около 3 дней. У младенцев после рождения концентрация антитромбина III примерно в 2 раза ниже и постепенно повышается в течение первых 6 мес жизни. Основное место синтеза антитромбина III — клетки паренхимы печени, но некоторое его количество синтезируется также и эндотелием. При инфузии антитромбина III восстановление его уровня в плазме происходит медленнее, чем можно было бы ожидать, исходя из объема крови и количества введенного белка. Это свидетельствует о том, что некоторое количество антитромбина III может депонироваться в тканях и выполнять роль буфера, поддерживающего стабильный уровень антитромбина III в плазме.

Антитромбин III состоит из 432 аминокислотных остатков, имеет 3 дисульфидных мостика и 4 участка гликозилирования. Реактивный центр образует пара Arg₃₉₃–Ser₃₉₄, но для специфичности действия важное значение имеет также и то, что в положении 392 находится глицин. Взаимодействие антитромбина III с тромбином протекает в две стадии. На первой образуется обратимый комплекс, в котором затем происходят расщепление ингибитора и образование ковалентной связи между ферментом и ингибитором.

Скорость ингибирования протеаз антитромбином III значительно повышается в присутствии сульфатированных олигосахаридов (один из представителей — гепарин). Минимальная структура, обеспечивающая активацию антитромбина III, — пентасахарид (рис. 2.6), содержащий четыре специфически расположенные сульфогруппы. Активирующее действие такого пентасахарида обусловлено влиянием на положение петли, содержащей реактивный центр. В антитромбине III в отличие от неактивируемых ингибиторов она частично погружена в основную структуру белка и экспонируется наружу после взаимодействия с кофактором. Такая мобильность реактивного центра обеспечивает возможность регуляции активности ингибитора и предохраняет чувствительный участок от неспецифической инактивации.

В физиологических условиях гепарин связывается с антитромбином III с высоким сродством и стехиометрически. Ведущая роль во взаимодействии с гепарином принадлежит остаткам

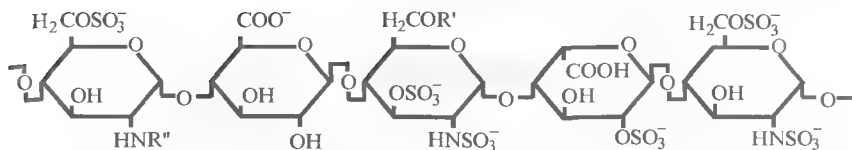


Рис. 2.6. Структура фрагмента гепарина, обеспечивающего активацию анти-тромбина III.

Arg₄₇, Lys₁₂₅, Arg₁₂₉, Arg₁₃₂, Lys₁₃₃. Они образуют сферу положительных зарядов антитромбина III, изменения пространственной локализации которых в результате модификации близлежащих аминокислот (Trp₄₉, Lys₅₃) или расщепления дисульфидной связи в С-концевой части молекулы приводят к снижению способности связывать гепарин.

Специфическое связывание гепарина зависит от третичной структуры антитромбина III и в то же время приводит к ее изменению. Одно из следствий изменения структуры антитромбина III — значительное увеличение скорости ингибирования тромбина. Кажущаяся константа скорости реакции возрастает от ~ 1 до $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Другое следствие изменения структуры — увеличение сродства к гепарину. После начального связывания гепарина с относительно низким сродством ($K_d \sim 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) происходят изменения структуры антитромбина III и сродство к гепарину повышается ($K_d \sim 10^{-8} \text{ M}$). После образования комплекса с протеазой и расщепления по реактивному центру происходят новые изменения конформации антитромбина III, приводящие уже к снижению сродства к гепарину. К следствиям снижения сродства к гепарину после образования комплекса протеаза–антитромбин III относят то, что в ингибировании протеаз гепарин действует как бы каталитически: после образования комплекса протеаза–антитромбин III он может высвобождаться из комплекса и участвовать в новом акте. Снижение сродства к гепарину после образования комплекса протеаза–антитромбин III может способствовать диссоциации комплекса с поверхности эндотелия и удалению его из крови.

Активация антитромбина III, обеспечиваемая пентасахаридным фрагментом, содержащим в определенных положениях сульфогруппы, — очень важный, но не единственный механизм,

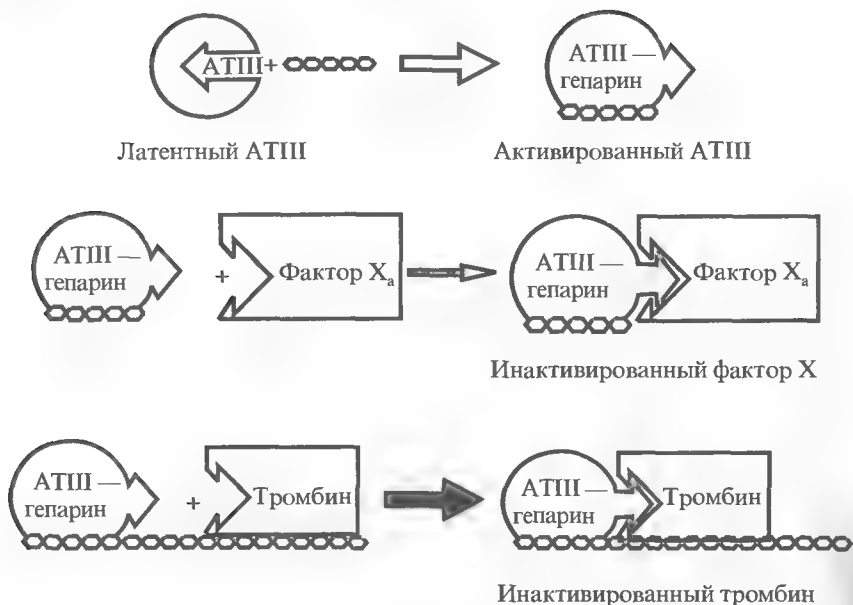


Рис. 2.7. Роль гепарина в инаktivации факторов свертывания. При связывании АТIII с пентасахаридом, содержащим четыре сульфогруппы (отмеченная * является критической), происходят изменения структуры ингибитора, вследствие которых экспонируется его реактивный центр. Этого достаточно для ингибирования фактора X_a . Высокая скорость ингибирования тромбина комплексом АТIII–гепарин обусловлена тем, что в этой реакции гепарин выполняет роль не только активатора АТIII, но и матрицы, обеспечивающей эффективное взаимодействие ингибитора с ферментом. Роль матрицы могут выполнять структуры, содержащие не менее 18 углеводных остатков. АТIII – антитромбин III.

определяющий антикоагулянтное действие гепарина. Высокая скорость ингибирования тромбина, примерно на порядок превышающая скорость ингибирования фактора X_a , обусловлена тем, что в этой реакции гепарин не только активирует антитромбин III, но и связывается с тромбином, выполняя роль матрицы, обеспечивающей эффективное взаимодействие протеазы с ингибитором (см. рис. 2.6; рис. 2.7). Кроме тромбина, это взаимодействие реализуется при ингибировании факторов IX_a и XI_a , но не играет существенной роли при ингибировании факторов X_a , XII_a и калликреина. Роль матрицы могут выполнять только те

молекулы гепарина, которые содержат не менее 18 сахаридных остатков.

В кровеносных сосудах функцию кофактора антитромбина III могут выполнять гликозаминогликаны и гликопротеины люминальной поверхности эндотелия, которые имеют гепариноподобные структуры. На взаимодействие антитромбина III и тромбина с гликопротеинами эндотелия и стенки сосудов влияет ряд белков плазмы. Богатый гистидином гликопротеин и секретируемый из α -гранул тромбоцитов фактор IV, а также витронектин могут связываться с гепариноподобными структурами и препятствовать инактивации тромбина и фактора X_a . Активированные нейтрофилы могут в значительной степени подавлять антикоагулянтные свойства поверхностных гликопротеинов эндотелиальных клеток, что может быть одним из механизмов развития тромбозов при сепсисе и воспалениях.

Таким образом, когда тромбин вымывается потоком крови из места образования и контактирует с неповрежденным эндотелием, он может быть нейтрализован антитромбином III, связанным с гликопротеинами стенки сосудов. Очевидно, что этот механизм инактивации тромбина более эффективно действует в микроциркуляции, где соотношение между объемом протекающей крови и поверхностью сосуда значительно выше, чем в магистральных сосудах.

НАСЛЕДСТВЕННЫЙ И ПРИОБРЕТЕННЫЙ ДЕФИЦИТ АНТИТРОМБИНА III

Частота наследственного дефицита антитромбина III в популяции, передаваемого как аутосомно-доминантный признак, составляет 1 случай на 2000–5000 человек. Наиболее частые клинические проявления дефицита антитромбина III — тромбозы глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии. Вероятность развития тромботических осложнений у больных с наследственным дефицитом антитромбина III увеличивается с возрастом и составляет менее 10% в возрасте до 15 лет и более 85% — старше 50 лет. Частота выявления дефицита антитромбина III у больных с венозными тромбозами составляет около 3%.

В плазме больных с наследственным дефицитом антитромбина III даже при отсутствии клинических признаков тромбозов

значительно повышено по сравнению с нормой содержание фрагмента F_{1+2} , отщепляющегося при активации от протромбина. Повышенный уровень фоновой активации свертывания крови при дефиците антитромбина III значительно увеличивает вероятность тромбообразования при наличии таких факторов риска, как травма, операция, инфекция, беременность и роды, прием пероральных контрацептивов.

В зависимости от того, какая из функций антитромбина III нарушена, выделяют несколько типов наследственного дефицита антитромбина III. Наиболее часто отмечают тип I дефицита, при котором примерно в одинаковой степени снижены функциональная активность антитромбина III и его концентрация. Этот тип дефицита подразделяют на 2 подгруппы. При типе I_a молекулярные свойства антитромбина III и $t_{1/2}$ в циркуляции не изменены, снижена только его концентрация. При типе I_b в дополнение к сниженной концентрации часть синтезирующихся молекул антитромбина III видоизменена.

Тип II характеризуется тем, что у больных концентрация антитромбина III находится в пределах нормы, но его свойства изменены. В зависимости от того, какие свойства нарушены, выделяют 3 подгруппы. В подгруппу II_a включены аномалии антитромбина III, когда наблюдают изменение нескольких функций. Например, в антитромбине III «Будапешт» в результате точечной замены $Pro_{429} Leu$ не образуется дисульфидная связь между Cys_{430} и Cys_{247} , что отражается в значительном изменении третичной структуры ингибитора и его способности взаимодействовать с протеазами и гепарином. В 2 другие подгруппы включены аномалии антитромбина III, при которых нарушено взаимодействие с протеазой (II_b) и гепарином (II_c). В популяции дефицит типа II_c в гетерозиготной форме встречается чаще, чем другие типы дефицитов, но тромбозы развиваются в редких случаях гомозиготной формы.

Приобретенный дефицит антитромбина III может быть обусловлен сниженным синтезом, повышенным потреблением или потерей белка при нефротическом синдроме и заболеваниях ЖКТ. Во всех этих случаях отмечают параллельное снижение концентрации и активности антитромбина III. Основное место синтеза антитромбина III — клетки паренхимы печени. Поэтому

заболевания, сопровождающиеся снижением белково-синтетической функции печени или трансапиллярного тока, приводят к снижению уровня антитромбина III. Снижение концентрации антитромбина III часто наблюдают в ходе развития ДВС-синдрома при разнообразных заболеваниях. На начальных этапах, когда снижение уровня антитромбина III еще не достигло критического уровня, терапия гепарином может быть достаточно эффективной. Однако антикоагулянтное действие гепарина определяется уровнем антитромбина III. При снижении уровня антитромбина III для достижения сопоставимого действия на свертывание крови требуется введение большего количества гепарина, чем при нормальном уровне антитромбина III. В то же время интенсивная гепаринизация может приводить к дальнейшему снижению уровня антитромбина III, обусловленному увеличением его потребления.

Снижение синтеза антитромбина III наблюдается при лечении L-аспарагиназой, эстрогенами и синтетическими препаратами, обладающими эстрогенным свойством.

КОФАКТОР II ГЕПАРИНА

Селективный ингибитор тромбина, получивший название кофактора II гепарина (ГК-II), принадлежит к семейству серпинов и характеризуется значительной структурной гомологией с антитромбином III, которая наиболее выражена вблизи реактивного центра и в положении аминокислот, принимающих участие во взаимодействии с гепарином. Сродство к гепарину у ГК-II на порядок ниже, чем у антитромбина III, но в отличие от последнего ГК-II активируется дерматансульфатом и многими другими синтетическими и природными полианионами. Минимальная структура, обеспечивающая активацию ГК-II, — сульфатированный гексасахарид.

Важная характеристика ГК-II — его селективность. Из протеаз крови с высокой скоростью он ингибирует только тромбин и значительно медленнее — лейкоцитарный катепсин G. При оптимальной концентрации дерматансульфата кажущиеся константы скорости второго порядка составляют $6,4 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ для тромбина и $8,4 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ для катепсина G. При этом реактивный центр ГК-II представлен парой аминокислот Leu₄₄₄—

Ser₄₄₅, связь между которыми тромбин в отличие от катепсина G в других белках не гидролизует. Замена Leu₄₄₄ Arg в рекомбинантном ГК-II приводит к увеличению на 2 порядка скорости ингибирования тромбина.

В N-концевой части молекулы ГК-II имеется фрагмент (остатки 54–75), содержащий 2 сульфатированных тирозина и характерную для С-концевой части гирудина последовательность кислых аминокислот, взаимодействующую с анионсвязывающим участком тромбина. Высокая специфичность ГК-II в ингибировании тромбина может быть обусловлена тем, что во взаимодействии с тромбином принимает участие не только реактивный центр ингибитора, но и специфическая последовательность кислых аминокислот N-концевой части молекулы.

Существенное различие между антитромбином III и ГК-II по тому, какой из гликозаминогликанов требуется им для проявления максимальной активности, свидетельствует о том, что эти 2 ингибитора могут взаимодополнять друг друга, контролируя активность тромбина в разных участках сосуда. Антитромбин III обеспечивает нейтрализацию тромбина при участии гепариноподобных структур на поверхности эндотелия, а ГК-II — во внутренней оболочке артерий и средней оболочке сосудов, где на долю дерматансульфата приходится до 70% от всех гликозаминогликанов.

ПРОТЕАЗНЫЙ НЕКСИН-I

Протеазный нексин-I (ПН-I) — белок с молекулярной массой 43 000 Д, принадлежащий к семейству серпинов, ингибирует протеазы системы фибринолиза, ПрС и тромбин. Гепарин повышает скорость ингибирования протеаз, и в его присутствии константа скорости ингибирования тромбина ПН-I достигает величины $4,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, что на порядок превышает значение, определенное для антитромбина III. В плазме концентрация ПН-I много ниже ($\sim 1 \text{ нг/мл}$), чем антитромбина III или ГК-II, однако ПН-I обнаружен на поверхности тромбоцитов, где его локальная концентрация может достигать величины, достаточной для регуляции активности тромбина и ПрС.

Другим местом действия ПН-I может быть межклеточное пространство. Связывание ПН-I с белками внеклеточного мат-

рикса повышает его специфичность как ингибитора тромбина. В наиболее высокой концентрации ПН-I присутствует в головном мозге в структурах, окружающих кровеносные сосуды и астроциты. Возможно, ПН-I — основной регулятор митогенной активности тромбина в межклеточном пространстве.

ИНГИБИТОР ТКАНЕВОГО ФАКТОРА

В плазме крови присутствует белок, при участии которого фактор X_a может ингибировать активацию фактора X комплексом фактор VII_a –тканевый фактор. Этот ингибитор получил несколько наименований: антиконвертин, ингибитор внешнего пути и ЛП-связанный ингибитор. XIII Конгресс международного общества по тромбозам и гемостазу рекомендовал использование термина ИПТФ.

Основное место синтеза и локализации ИПТФ — клетки эндотелия капилляров и мегакариоциты. Некоторое количество ИПТФ может синтезироваться также и моноцитами. Гепатоциты не содержат иРНК, кодирующую ИПТФ, и уровень этого ингибитора не снижается при поражениях печени.

В плазме основная часть ИПТФ находится в виде комплекса с ЛП: ~50% его связано с ЛПНП и ТГ, 40–45% — с ЛПВП, где он ковалентно связан дисульфидным мостиком с апобелком А-II, и только 5–10% приходится на свободную форму, обладающую наибольшей антикоагулянтной активностью. Некоторое количество ИПТФ находится в тромбоцитах и секретируется при их активации, что может повышать локальную концентрацию этого ингибитора в области тромбообразования.

У больных с нарушениями липидного обмена концентрация ИПТФ в плазме повышена. Наиболее высокое содержание ИПТФ характерно для гиперлипидемии типа II_a и II_b , что, по-видимому, обусловлено перераспределением ингибитора между эндотелием и ЛП. Концентрация ИПТФ в плазме значительно повышается при инъекции гепарина, но длительная гепаринотерапия может приводить к заметному снижению уровня свободного ИПТФ в плазме и его антикоагулянтного действия.

ИПТФ синтезируется как полипептид, состоящий из 276 аминокислотных остатков. Он может подвергаться посттрансля-

ционному N-гликозилированию по остаткам аспарагина в положениях 117, 167 и 228, сульфатированию олигосахаридной цепочки и фосфорилированию по Ser₂. Физиологическое значение этих модификаций не установлено. В N-концевой области белка имеется последовательность кислых аминокислот, за которой следуют 3 гомологичных участка, образующих домены ингибитора Кунитца, а С-концевая область представлена участком, содержащим большое количество щелочных аминокислот. Ряд связей этого участка легко подвергается протеолизу и в плазме ИПТФ присутствует в виде нескольких форм с молекулярной массой от 34 до 41 кД. Протеолиз С-концевой области ИПТФ приводит к потере его способности взаимодействовать с ЛП.

Гепарин увеличивает эффективность ингибирования протеаз. В С-концевой части ИПТФ обнаружено 2 участка связывания гепарина. Один из них — последовательность щелочных аминокислот, а другой — фрагмент Gly₂₁₂–Phe₂₄₃, входящий в структуру третьего ингибиторного домена. Наибольшим сродством обладают молекулы гепарина, имеющие молекулярную массу более 10 кД и/или высокую плотность зарядов. Специфическая пентасахаридная последовательность, обеспечивающая активацию антитромбина III, не участвует во взаимодействии с ИПТФ.

Каждый из 3 ингибиторных доменов ИПТФ обладает потенциальным реактивным центром, находящимся в области жесткой третичной структуры, поддерживаемой 3 дисульфидными мостиками на протяжении ~50 аминокислотных остатков. Эффективная инактивация протеаз ингибиторами Кунитца обеспечивается тем, что их структура хорошо соответствует структуре субстрат-связывающего участка активного центра протеазы. В отличие от серпинов ИПТФ не образует ковалентной связи с протеазой и может быть вытеснен из активного центра конкурентным ингибитором. Три ингибиторных домена ИПТФ характеризуются значительной гомологией структуры, но только два из них непосредственно участвуют в ингибировании, и каждый обладает специфичностью в отношении ингибируемой протеазы. Первый домен связывается с активным центром фактора VII_a, а второй — фактора X_a. Таким образом, одна молекула ИПТФ может инактивировать два фактора свертывания, но при этом эффективное ингибирование фактора VII_a наблюдают лишь в присутствии

фактора X_a и тканевого фактора. Для описания ингибирования активации свертывания крови под действием ИПТФ был предложен двухстадийный механизм. Вначале ИПТФ образует обратимый комплекс с фактором X_a , который затем связывается с комплексом фактор VII_a –тканевый фактор. В результате образуется четырехкомпонентный комплекс, стабильность которого обеспечивается множественными взаимодействиями: ингибиторных доменов с активными центрами, Gla -доменов с тканевым фактором, гидрофобных участков с фосфолипидами.

Исследования влияния ИПТФ и антитромбина III на активацию свертывания *in vitro* показали, что продолжительность лаг-фазы в образовании тромбина определяется концентрацией тканевого фактора и ИПТФ. Эти данные свидетельствуют о том, что функция ИПТФ состоит в снижении скорости образования факторов IX_a и X_a до величины, при которой их активность может контролироваться антитромбином III. Антитромбин III и ИПТФ, действуя на разные стадии активации, обеспечивают наличие определенного порога, только после преодоления которого может начаться массивная генерация тромбина, необходимая для свертывания крови.

Введение рекомбинантного ИПТФ в дозах, не оказывающих выраженного влияния на изменение основных коагулологических тестов, значительно замедляет тромбирование механически поврежденных участков вен кроликов и снижает частоту реокклюзий после тромболизиса тканевым активатором Пг артериальных и венозных тромбов. Локальное введение ИПТФ в область повреждения внутренней оболочки артерий при баллонной ангиопластике ингибирует образование тромбоцитарных агрегатов и тромбов на поврежденной поверхности, а также развитие рестенозов после операции.

2.3. СИСТЕМА ПРОТЕИНА С

ПРОТЕИН С

В 1976 г. во фракции витамин К-зависимых факторов свертывания был обнаружен белок, который был назван протеином С (ПрС). Вскоре оказалось, что этот белок идентичен опи-

санному ранее аутопротромбину II-A и служит проферментом, который после активации тромбином специфически расщепляет факторы V_a и $VIII_a$, что приводит к прерыванию каскада реакций активации свертывания крови.

ПрС синтезируется в печени как полипептид, состоящий из 461 аминокислотного остатка, включая 42-членный сигнальный пептид, необходимый для посттрансляционного γ -карбоксилирования 9 остатков Gln. ПрС подвергается N-гликозилированию по 4 участкам, его молекулярная масса составляет 62 кД. В плазме ПрС находится в 2-цепочечной форме, образующейся в результате расщепления связи Arg₁₅₇-Thr₁₅₈ в молекуле предшественника и удаления 2 С-концевых аминокислот легкой N-концевой цепи. Концентрация ПрС в плазме составляет ~ 4 мг/л, а $t_{1/2}$ — 6–8 ч.

Легкая цепь ПрС состоит из Gla-домена и 2 EGF-доменов, которые обеспечивают связывание Ca^{2+} с высоким сродством и взаимодействие ПрС с фосфолипидами, комплексом тромбин-тромбомодулин, протеином S и фактором V_a . Тяжелая цепь ПрС содержит протеолитический домен, который гомологичен другим протеазам свертывания и трипсину. Активный центр образуют остатки His₂₁₁, Asp₂₅₇ и Ser₃₆₀. ПрС обладает узкой субстратной специфичностью и с высокой скоростью расщепляет только активированные формы факторов V_a и $VIII_a$.

Активация ПрС происходит в результате расщепления связи Arg₁₆₉-Leu₁₇₀ в N-концевой части тяжелой цепи и сопровождается освобождением пептида активации. Впервые ПрС был активирован тромбином и протеазой из яда змеи Рассела. Однако свободный тромбин активирует ПрС с очень низкой скоростью и только в отсутствие ионов Ca^{2+} . Эндотелий сосудов в тысячи раз ускоряет активацию ПрС благодаря тромбомодулину, обеспечивающему активацию ПрС тромбином.

ТРОМБОМОДУЛИН

Тромбомодулин (ТМ) — трансмембранный гликопротеин, состоящий из 557 аминокислотных остатков. На N-конце молекулы ТМ находится домен, гомологичный лектинам, за которым следуют 6 повторяющихся EGF-доменов, а также фрагмент, обогащен-

ный Ser/Thr, содержащий хондроитинсульфатную боковую цепь и участки О-гликозилирования, затем трансмембранный домен и короткий С-концевой цитоплазматический участок.

ТМ связывает тромбин с высоким родством ($K_d \sim 0,5$ нМ). Связывание тромбина и изменение его субстратной специфичности обеспечиваются структурами 5-го и 6-го EGF-доменов, которые взаимодействуют с субстратсвязывающим участком активного центра тромбина, и хондроитинсульфатной цепью, которая связывается с последовательностью щелочных аминокислот тромбина. Наличие на ТМ 2 участков взаимодействия с тромбином подтверждается связыванием двух молекул тромбина с одной молекулой ТМ. Во взаимодействии с ПрС и его активации важная роль принадлежит Asp₃₄₉ 4-го EGF-домена и области, связывающей 4-й и 5-й EGF-домены ТМ.

Связывание тромбина с ТМ увеличивает каталитическую эффективность реакции активации ПрС в $\sim 20\,000$ раз и ингибирует прокоагулянтные функции тромбина: активацию тромбоцитов, фактора V и свертывание фибриногена. ТМ, кроме изменения направленности каталитического действия тромбина, может выполнять и функцию удаления этого белка. Связывание с ТМ стимулирует эндоцитоз комплекса и разрушение тромбина лизосомальными ферментами, а также инактивацию тромбина антитромбином III.

ТМ экспрессируется в эндотелиальных клетках вен, артерий, капилляров и лимфатической системы большинства органов, за исключением головного мозга. Содержание иРНК, кодирующей ТМ, убывает в последовательности: сердце > поджелудочная железа > легкие > скелетные мышцы > почки > печень > плацента. Концентрация ТМ в микроциркуляции может достигать ~ 10 нМ. В следовых количествах ТМ обнаруживается также в тромбоцитах, плазме и моче.

Синтез ТМ может стимулироваться тромбином, цАМФ, ретиноевой кислотой, пентоксифиллином и ИЛ-4. Экспрессия ТМ может снижаться под воздействием эндотоксина, ИЛ-1, TNF, гипоксии и ряда инфекций. Поскольку большинство из перечисленных воздействий стимулирует синтез тканевого фактора, то в результате может происходить значительное изменение

соотношения между про- и антикоагулянтными активностями эндотелия.

Приемлемых для клинических исследований методов определения функциональной активности ТМ пока не предложено. В экспериментах на мышах показано, что полная инактивация гена ТМ приводит к гибели эмбрионов на стадии, предшествующей развитию ССС. Это свидетельствует о том, что функция ТМ, по-видимому, не ограничивается только контролем свертывания крови. Обнаружено, что описанный ранее поверхностный белок плода фетомодулин по структуре и свойствам идентичен ТМ. ТМ может конкурировать с клеточным рецептором за связывание с тромбином и таким образом подавлять митогенное действие тромбина и его влияние на экспрессию молекул адгезии на эндотелии. При гетерозиготной форме дефицита ТМ тромбозы у животных развивались лишь при наличии дополнительных повреждающих стимулов.

ПРОТЕИН S

Протеин S (PrS) — витамин К-зависимый белок, увеличивающий скорость инактивации протеином С факторов V_a и $VIII_a$ в составе протромбиназного и X-азного комплексов. Потенцирующий эффект наблюдают только в присутствии фосфолипидов, и функция PrS может заключаться в повышении сродства PrS_a к мембранам.

PrS синтезируется в печени, эндотелии, интерстициальных клетках семенников и мегакариocyтах. Секретируется PrS как обладающий активностью одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой ~ 80 кД, состоящий из 635 аминокислотных остатков. N-концевая область PrS характеризуется высокой степенью гомологии с другими витамин К-зависимыми белками. Она состоит из Gla-домена и 4 EGF-доменов. Между Gla-доменом и 1-м EGF-доменом аминокислотная последовательность образует стабилизированную дисульфидным мостиком петлю, 2 связи которой легко расщепляются тромбином. Расщепление приводит к инактивации PrS. В отличие от других витамин К-зависимых белков C-концевая часть молекулы PrS не содержит протеазного домена. Аминокислотная последовательность в об-

ласти остатков 243–635 гомологична таковой глобулина, связывающего половые гормоны, но специфического связывания стероидов с ПрС не обнаружено.

ПрС связывается с высоким сродством ($K_d \sim 0,5$ нМ) с С4b-связывающим белком (С4b-СБ) системы комплемента. В плазме около половины ПрС находится в виде комплекса с С4b-СБ, который не обладает антикоагулянтной активностью. В образовании комплекса принимают участие С-концевая область ПрС и N-концевая область β -цепи С4b-СБ. Участки связывания С4b-компонента находятся на α -цепях С4b-СБ, и связывание ПрС не влияет на взаимодействие и расщепление этого компонента протеазным фактором I системы комплемента. Это свидетельствует о том, что ПрС, обладающий высоким сродством к фосфолипидам, может участвовать также и в локальной регуляции воспалительного процесса.

СИСТЕМА ПРОТЕИНА С В РЕГУЛЯЦИИ

Факторы IX_a и X_a в составе протромбиназного и теназного комплексов на поверхности фосфолипидов частично защищены от действия антитромбина III, во-первых, из-за препятствий, создаваемых компонентами комплексов. Кроме того, антитромбин III активируется на поверхности неповрежденных эндотелиальных клеток, а активированные факторы свертывания образуются на фрагментах мембран клеток или тромбоцитах, т. е. пространственно разобщены. Когда тромбин вымывается потоком крови из места образования и контактирует с неповрежденным эндотелием, то он может либо инактивироваться антитромбином III, либо связаться с ТМ и активировать ПрС. Последний, действуя каталитически, расщепляет активированные формы факторов V и VIII, что приводит к распаду комплексов и подавлению свертывания, а свободные формы факторов IX_a и X_a могут ингибироваться антитромбином III при контакте с эндотелием (рис. 2.8).

Функция системы ПрС, по-видимому, не ограничивается только остановкой процесса свертывания крови. Инфузия ПрС_a оказывала более выраженное защитное действие по сравнению с другими антикоагулянтами на выживаемость обезьян при экс-

выполняет роль матрицы, на которой происходит взаимодействие PrC_a с ингибитором.

Кроме перечисленных выше ингибиторов в инактивации PrC_a в плазме могут принимать участие α_2 -антиплазмин и α_2 -макроглобулин, а также ИПТФ в присутствии гепарина. Наличие конкуренции между фактором X_a и PrC_a за взаимодействие с ИПТФ свидетельствует о том, что инактивация PrC_a обеспечивается вторым ингибиторным доменом ИПТФ.

Наследственный и приобретенный дефицит

Дефицит PrC или PrS , как и дефицит антитромбина III, — факторы, предрасполагающие к развитию венозных тромбозов и тромбоэмболий. При гетерозиготной форме дефицита тромбозы редко проявляются в возрасте до 14 лет, но вероятность их развития значительно увеличивается с возрастом и при наличии других осложняющих факторов, таких, как травмы, операции и иммобилизация больного, беременность и использование пероральных контрацептивов. Значительных отличий в клинической картине тромбозов при дефиците антитромбина III, PrC или PrS не обнаружено, за исключением несколько более высокой вероятности тромбофлебитов при дефиците PrC/PrS и тромбозов при беременности и приеме пероральных контрацептивов у носителей с дефицитом антитромбина III. Дефицит PrS может предрасполагать и к развитию артериальных тромбозов в молодом возрасте. Гомозиготный дефицит PrC или PrS встречается крайне редко и связан с тяжелыми тромботическими осложнениями в неонатальном периоде.

Частота гетерозиготного дефицита PrC в популяции может составлять 1 случай на 300 человек. У больных с семейными тромбозами частота выявления дефицита PrC или PrS составляет 2–5%. Классификация врожденного дефицита PrC включает 2, а PrS — 3 типа. Чаще всего отмечают тип I дефицита, при котором наблюдают параллельное снижение функциональной активности и концентрации этих белков. Тип II дефицита характеризуется более выраженным снижением функциональной активности по сравнению с концентрацией этих белков. К типу III дефицита PrS относят случаи, когда снижено содержание

свободной формы белка при близком к норме содержании общего ПрС. Всего к настоящему моменту охарактеризовано около 30 нуклеотидных замен в ДНК, кодирующей ПрС. В большинстве случаев это происходит в результате превращения 5-метилцитозина в тимин вследствие дезаминирования в нуклеотидной паре СpG. Сложная организация гена ПрС (длина более 80 тысяч пар оснований, 15 экзонов, 14 интронов и наличие псевдогена) ограничивает возможности исследования; молекулярные основы дефицита ПрС установлены лишь у нескольких больных.

Изменение соотношения между свободной и связанной с С4b-СВ формами ПрС может лежать в основе приобретенного дефицита ПрС при нефротическом синдроме, когда в результате нарушения процесса реабсорбции белков в проксимальных канальцах нефронов свободный ПрС выходит в мочу, а высокомолекулярный комплекс ПрС с С4b-СВ не подвергается клубочковой фильтрации. Снижение концентраций ПрС и ПрС наблюдается при беременности и приеме гормональных контрацептивов, заболеваниях печени и ДВС. Существуют данные о снижении уровня ПрС при гемохистеинурии.

Для лечения и профилактики повторных тромбозов у больных с дефицитом ПрС или ПрС применяют антагонисты витамина К. В начале терапии наблюдают транзиторное состояние гиперкоагуляции, обусловленное более быстрым снижением концентрации ПрС и ПрС, чем витамин К-зависимых факторов свертывания, которое может привести к развитию некроза кожи у больных с исходно сниженным уровнем ПрС или ПрС. Во избежание этого рекомендуют начинать прием антагонистов витамина К на фоне гепаринотерапии и только после достижения требуемого стабильного уровня антикоагуляции отменять гепарин.

Резистентность и тромбозы

Исследование влияния экзогенного ПрС_a на свертываемость *in vitro* крови членов семьи с тромбофилией привело к открытию феномена резистентности к ПрС_a. Для достижения такой же степени удлинения АЧТВ, как в плазме доноров, к плазме этих больных необходимо было добавить значительно больше

ПрС_а. Молекулярный механизм, лежащий в основе обнаруженного феномена, был идентифицирован как замена в факторе V Arg₅₀₆ на Gln. Такая форма фактора V, обладающая нормальной коагулянтной активностью, но устойчивая к расщеплению под действием ПрС_а, была названа фактором V_{Лейден}.

ПрС_а расщепляет 3 пептидные связи в N-концевой цепи фактора V_а, причем скорость гидролиза по Arg в положениях 306 и 679 увеличивается после расщепления по Arg₅₀₆. Замена Arg₅₀₆ Gln делает невозможным расщепление трипсиноподобной протеазой по этому участку, и в результате инактивация фактора V_{Лейден} под действием ПрС_а протекает значительно медленнее, чем нормального.

Замена Arg₅₀₆ Gln — наиболее часто встречающаяся (но не единственная) причина врожденной резистентности к ПрС_а. В экзоне 13 гена фактора V обнаружены полиморфные участки, которые могут быть связаны с резистентностью к ПрС_а.

Резистентность к ПрС_а обнаруживают у 10–20% больных, страдающих тромбозом глубоких вен. При селективном анализе семейных венозных тромбозов частота выявления резистентности достигает 50%, а при тромбозах, связанных с беременностью, может доходить до 60%, что в 10 раз выше, чем суммарная частота выявления молекулярных дефектов антитромбина III, ПрС и ПрS при этой патологии. В популяции частота гетерозиготных носителей фактора V_{Лейден} составляет 3–5%, а при обследовании 50 больных с резистентностью к ПрС_а гомозиготная форма выявлена у 6 из 47 носителей. Эти данные свидетельствуют о том, что замена Arg₅₀₆ на Gln в факторе V — наиболее часто встречающийся генетический дефект, связанный с заболеванием. Однако статистический анализ связи данной мутации с тромбозами показал, что этот дефект *per se* менее значим, чем дефекты других компонентов системы противосвертывания.

Риск развития венозных тромбозов у больных с резистентностью к ПрС_а многократно возрастает при наличии других предрасполагающих факторов, таких, как дефицит компонентов противосвертывающей системы, травма, операция, беременность и использование пероральных контрацептивов. Пероральные контрацептивы *per se* могут вызывать феномен резистентности к ПрС_а, сравнимый по величине с гетерозиготным дефектом

в факторе V. У женщин фактор V_{Лейден} — также и фактор риска инфаркта миокарда в молодом возрасте. Риск инфаркта миокарда значительно возрастет при сочетании фактора V_{Лейден} с метаболическими нарушениями. Наиболее значимым следует считать сочетание мутации и курения, при котором отмечали 30–50-кратное увеличение риска инфаркта миокарда.

Чувствительность фактора V_a к протеолизу под действием ПрС_a может изменяться также в результате посттрансляционных модификаций. *In vitro* показано, что скорость инактивации фактора V_a под действием ПрС_a увеличивается после дегликозилирования или фосфорилирования тромбоцитарной казеинкиназой-II. Феномен резистентности к ПрС_a может развиваться в результате повышения в плазме концентрации фактора VIII — другого субстрата ПрС_a, способного конкурентно снижать скорость протеолиза фактора V_a комплексом ПрС_a–ПрS. К числу наиболее часто встречающихся причин приобретенной резистентности к ПрС_a могут быть отнесены нарушения иммунной системы.

АНТИФОСФОЛИПИДНЫЙ СИНДРОМ

Еще в начале 50-х годов было обнаружено, что у больных системной красной волчанкой появляется ингибитор свертывания крови, который впоследствии был назван волчаночным антикоагулянтом. Установлению природы ингибитора способствовало выявление нормализации свертываемости крови после добавления избытка фосфолипидов, а не нормальной плазмы, как в случае гемофилии. Методом радиоиммунного анализа было показано, что развитие тромбозов у больных системной красной волчанкой связано с появлением в плазме АТ, взаимодействующих с кардиолипином, и волчаночный антикоагулянт был первоначально идентифицирован как АТ к фосфолипидам. Широкое использование высокочувствительных методов анализа показало, что АТ к фосфолипидам появляются при многих заболеваниях и могут быть вызваны также приемом лекарств и неблагоприятными экологическими факторами. Это привело к внедрению термина «антикардиолипиновый», а затем «антифосфолипидный синдром».

АТ могут быть представлены иммуноглобулинами классов G, M или A и проявлять различные свойства как клинически, так и при исследованиях с использованием разных тест-систем. Например, было отмечено, что тромбозы более характерны для аутоиммунных, чем для инфекционных заболеваний, а применение колонки с фосфолипидами позволило разделить АТ к кардиолипину и волчаночный антикоагулянт. Такое разнообразие АТ следовало ожидать, если бы в роли Ag выступали только фосфолипиды, и вскоре выявили, что в действительности АТ образуются к белок-фосфолипидным комплексам. Наиболее частый Ag для образования антикардиолипидных АТ — комплекс β_2 -гликопротеин I (апоЛП Н) с анионными фосфолипидами, а для волчаночного антикоагулянта — протромбин-фосфолипидный комплекс. У больных с антифосфолипидным синдромом обнаружены также АТ к аннексину-V, ПрС и ПрS, тромбомодулину и гепарину. Эти АТ могут значительно различаться по сродству, влиянию на активность факторов свертывания и $t_{1/2}$ АТ в кровотоке.

АТ к фосфолипидам могут нарушать следующие мембранзависимые реакции системы гемостаза: синтез и секрецию вазоактивных соединений; активацию витамин К-зависимых факторов свертывания; активацию ПрС; инактивацию факторов V_a и $VIII_a$ комплексом ПрС₂–ПрS; активацию антитромбина III гликопротеинами эндотелия.

Таким образом, АТ к фосфолипидам были первоначально идентифицированы как антикоагулянт, замедляющий свертывание крови *in vitro*. Однако их способность ингибировать основные реакции системы противосвертывания при наличии прокоагулянтного влияния на тромбоциты и эндотелий приводит к тому, что у больных с антифосфолипидным синдромом риск тромбозов значительно выше риска кровотечений.

Клинически антифосфолипидный синдром характеризуется рецидивирующими тромбозами различной локализации. Тромбы могут развиваться в венозной (70%) и артериальной (30%) системах, а также в системе микроциркуляции. В случаях повторных спонтанных выкидышей и внутриутробной гибели плода, причиной которых могут быть тромбозы сосудов плаценты, частота обнаружения АТ к фосфолипидам доходит до 50%. Так,

при антифосфолипидном синдроме могут быть выявлены тромбозы глубоких вен голени, цереброваскулярные нарушения (синдром Снеддона), обусловленные тромбозом сосудов мозга. Livedo reticularis — рисунок на коже, напоминающий кружева или ячейки рыболовной сети, чаще локализованный в области нижних конечностей и обусловленный венозным застоем. Также возможны легочная гипертензия, синдром Бадда–Киари (сочетание симптомов внутрипеченочной портальной гипертензии, возникающее при нарушении оттока крови из печеночных вен вследствие их тромбоза), инфаркт миокарда, гемолитическая анемия, тромбоцитопения, тромботический неинфекционный эндокардит (чаще с поражением митрального и аортального клапанов), асептические некрозы головок бедренных костей, а также ложноположительная реакция Вассермана.

СИСТЕМА ФИБРИНОЛИЗА

Образование фибрина выполняет важную защитную функцию, обеспечивая остановку кровотечения в местах повреждения сосудов. После выполнения гемостатической функции и регенерации ткани фибрин должен быть удален для восстановления нормального кровотока. Это осуществляется фибринолитической системой, состоящей из профермента (плазминогена), ферментов, превращающих Пг в сериновую протеазу, и сложной системы ингибиторов, контролирующих как активацию Пг, так и сам процесс лизиса фибрина (рис. 2.9, табл. 2.3).

Кроме удаления внутрисосудистых тромбов компоненты системы фибринолиза участвуют также в разрушении внеклеточного матрикса и могут выполнять важную функцию в регуляции таких процессов, как эмбриогенез, регенерация тканей, рост и метастазирование опухолей.

ПЛАЗМИНОГЕН И ПЛАЗМИН

Фермент, непосредственно расщепляющий фибрин, — плазмин (ПЛ), образующийся при активации Пг. Пг синтезируется в печени и секретируется как одноцепочечный белок, состоящий из 790 аминокислотных остатков и содержащий Glu в качестве N-концевой аминокислоты, но в плазме присутствует в виде

Таблица 2.3. Основные компоненты системы фибринолиза

Название	Молекулярная масса, кД	Содержание в плазме	$t_{1/2}$	Функция
Пг	90	0,2 мг/мл	50 ч	Профермент
Тканевый активатор Пг	70	5–10 нг/мл	3–5 мин	Активатор Пг
Урокиназа	55 31	1 нг/мл	3–5 мин	Активатор Пг
Прекалликреин	88	0,04 мг/мл	25 ч	Профермент
Фактор XII	80	0,03 мг/мл	60 ч	Профермент
α_2 -Антиплазмин	70	0,07 мг/мл	50 ч	Ингибитор плазмина
α_2 -Макроглобулин	4·160	2,5 мг/мл	—	Поливалентный ингибитор
Ингибитор активаторов Пг типа 1	50	60 нг/мл	5–7 мин	Ингибитор тАП и урокиназы
Ингибитор активаторов Пг типа 2	70	< 5 нг/мл	—	Ингибитор урокиназы
C1-ингибитор	105	0,2 мг/мл	—	Ингибитор системы комплемента и контактной активации
Богатый гистидином гликопротеин	75	0,1 мг/мл	—	Связывание Пг
Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза	49	2,5 мкг/мл	—	Ингибирование взаимодействия Пг с фибрином

нескольких изоформ. Наличие 2 основных изоформ обусловлено разной степенью гликозилирования. Glu–Пг I содержит 2 углеводные цепочки, связанные с Asn₂₈₈ и Thr₃₄₅, а Glu–Пг II — только одну, связанную с Thr₃₄₅. Степень гликозилирования влияет на сродство Пг к остаткам Lys, а также на скорость его активации и расщепления плазмином. Плазмин легко рас-

щепляет 3 связи — Arg₆₇–Met₆₈, Lys₇₆–Lys₇₇ или Lys₇₇–Val₇₈ — в молекуле Пг с высвобождением N-концевого полипептида. Образующиеся при этом формы Пг обладают сходными свойствами, и их принято называть Lys–Пг независимо от того, какова в действительности N-концевая аминокислота. Lys–Пг активируется с большей скоростью, чем Glu–Пг, и быстрее выводится из кровотока. Различия в скорости активации особенно заметны в отсутствие кофакторов активации, таких, как фибрин или аналоги Lys. Эластаза может селективно расщеплять Пг с образованием мини-Пг (Val₃₅₄–Пг), не содержащего первых 3 крингл-доменов.

Третичная структура Пг характеризуется высокой стабильностью, которая обеспечивается 24 дисульфидными мостиками. Большая часть структуры приходится на 5 крингл-доменов, содержащих так называемые лизинсвязывающие участки. На крингл-1 находится участок высокого сродства ($K_d \sim 9$ мкМ), на остальных — участки низкого сродства ($K_d \sim 5$ мМ). Крингл-доменам принадлежит важная функция в связывании Пг с фибрином и мембранами клеток, в активации Пг, а также в обеспечении специфичности и локализации действия плазмина.

Активация Пг происходит в результате расщепления связи Arg₅₆₁–Val₅₆₂ с образованием фермента, состоящего из 2 цепей, соединенных 2 дисульфидными мостиками. Активный центр находится в легкой В-цепи (С-концевой фрагмент Пг) и представлен остатками His₆₀₂, Asp₆₄₅ и Ser₇₄₀. Легкая цепь — малоспецифическая трипсиноподобная протеаза, способная расщеплять практически все белки плазмы. Специфичность действия плазмина обеспечивается крингл-доменами тяжелой А-цепи (N-концевой фрагмент Пг).

ИНГИБИТОРЫ ЛИЗИСА ФИБРИНА

α_2 -Антиплазмин (α_2 -АП) принадлежит к семейству серпинов. Молярная концентрация α_2 -АП в плазме в 2 раза ниже, чем концентрация Пг. α_2 -АП синтезируется в печени и секретируется как одноцепочечный гликопротеин, состоящий из 464 аминокислотных остатков. В крови α_2 -АП присутствует в виде 2 форм: Met- α_2 -АП и Asn- α_2 -АП. Asn- α_2 -АП образуется в результате

отщепления 12-членного пептида от N-конца Met- α_2 -АП. Обе формы α_2 -АП ингибируют плазмин в растворе с одинаковой скоростью, но Met- α_2 -АП обладает меньшим сродством к фибрину, чем Asn- α_2 -АП.

α_2 -АП ингибирует свободный плазмин с очень высокой скоростью ($t_{1/2} \sim 0,1-0,5$ с). Реакция протекает в две стадии. Вначале быстро образуется обратимый комплекс α_2 -АП-плазмин ($K_d \sim 2 \cdot 10^{-10}$ М), в котором затем происходит медленное расщепление α_2 -АП по реактивному центру Arg₃₅₄-Met₃₅₅. С-концевой фрагмент α_2 -АП остается нековалентно связанным с крингл-1, а N-концевая часть образует ковалентную связь с Ser активного центра плазмина. Взаимодействие α_2 -АП с субстратсвязывающим участком обеспечивает селективность действия плазмина. В присутствии быстродействующего ингибитора этот фермент может проявлять свою активность только в месте образования до тех пор, пока остается связанным с фибрином.

Кроме ингибирования плазмина в кровотоке α_2 -АП принадлежит важная роль в стабилизации фибрина. При полимеризации в фибрин включаются как Пг, так и α_2 -АП в примерно равном количестве. Причем α_2 -АП связывается, а затем и сшивается фактором XIII_a с С-концевой областью α -цепи фибрина, которая в первую очередь расщепляется под действием плазмина. Сшитый с фибрином α_2 -АП инактивирует плазмин, образовавшийся из связанного при полимеризации Пг, после расщепления С-концевой области α -цепи фибрина, которое еще не приводит к распаду полимера, но открывает новые участки связывания с высоким сродством Пг к тАП. Расщепление фибрина до растворимых фрагментов происходит после активации Пг, связывающегося с частично разрушенным фибрином. Наличие двух стадий в лизисе фибрина — один из механизмов, обеспечивающих смещение во времени процессов образования и лизиса фибрина. Кроме этого, тот факт, что растворение фибрина происходит путем связывания с ним Пг из кровотока, обеспечивает протекание лизиса с поверхности тромба, тем самым предотвращая образование эмболов.

α_2 -Макроглобулин (α_2 -МГ) — полифункциональный ингибитор протеаз. Это гликопротеин с молекулярной массой 725 кД,

состоящий из 4 идентичных субъединиц. В его структуре имеется последовательность Arg₆₈₁-Val-Gly-Phe-Tyr-Glu₆₈₆, пептидные связи которой могут расщепляться многими типами протеаз. Расщепление приводит к конформационным изменениям α_2 -МГ, в результате которых гидролизуется тиоэфирная связь между Cys₉₄₉ и Gln₉₅₂, а карбонильный радикал образует ковалентную связь с протеазой, но в отличие от серпинов не по активному центру. Поэтому комплекс протеаза- α_2 -МГ сохраняет способность расщеплять низкомолекулярные субстраты, а взаимодействие с белками становится невозможным из-за препятствий, создаваемых макромолекулой ингибитора. Комплекс протеаза- α_2 -МГ связывается с рецепторами на фибробластах, макрофагах и клетках РЭС, транспортируется внутрь клеток и расщепляется лизосомальными протеазами.

α_2 -МГ ингибирует плазмин со скоростью, значительно меньшей, чем α_2 -АП, но в плазме молярное соотношение Пг/ α_2 -АП составляет 2 : 1, и α_2 -МГ может играть важную роль в инактивации плазмينا при потреблении α_2 -АП.

Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза. Стимулом к открытию еще одного ингибитора фибринолиза послужило наблюдение зависимости скорости лизиса сгустков плазмы от количества образовавшегося тромбина. Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (АТИФ) был выделен и идентифицирован как карбоксипептидаза U (прокарбоксипептидаза В плазмы), специфически отщепляющая С-концевые остатки Lys, которые экспонируются после частичного расщепления фибрина и формируют новые участки связывания тАП и Пг. Это приводит к снижению скорости лизиса фибрина.

Свободный тромбин активирует АТИФ с низкой скоростью, поэтому антифибринолитический эффект этого ингибитора зависит от количества тромбина, образующегося при активации свертывания крови. Компоненты системы ПрС могут оказывать разнонаправленное действие на АТИФ. Активация ПрС и расщепление фактора V_a снижают количество образующегося тромбина, что должно приводить к снижению скорости активации АТИФ. В то же время связывание тромбина с ТМ приводит не только к активации ПрС, но и к 1000-кратному увеличению скорости активации АТИФ комплексом тромбин-ТМ. Резуль-

тирующая этих двух процессов зависит от многих параметров, определяющих формирование тромба *in vivo*.

Богатый гистидином гликопротеин. К числу ингибиторов фибринолиза может быть отнесен и богатый гистидином гликопротеин (БГГ). Этот белок с молекулярной массой 75 кД присутствует в плазме и тромбоцитах, из которых секретируется при активации. БГГ обладает высоким сродством к лизинсвязывающему центру 1 Пг ($K_d \sim 1$ мкМ) и может служить конкурентным ингибитором взаимодействия Пг с фибрином. В плазме $\sim 50\%$ Пг находится в виде комплекса с БГГ, обладающего низким сродством к фибрину. В то же время БГГ, секретируемый активированными тромбоцитами, связывается с их поверхностью и может выполнять роль буфера, обеспечивающего накопление Пг в области тромбообразования.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА И ФИБРИНА ПЛАЗМИНОМ

Плазмин расщепляет пептидные связи фибриногена в определенном порядке с образованием продуктов разрушения, обозначаемых как X-, Y-, D- и E-фрагменты. Наиболее чувствительна к протеолизу С-концевая часть $A\alpha$ -цепи, способная расщепляться по остаткам 584, 425 и 207. Затем происходит отщепление N-концевого 42-членного пептида В β -цепи. Фибриноген — симметричная структура, но расщепление по отмеченным остаткам может протекать асимметрично с образованием набора X-фрагментов, имеющих молекулярную массу от 330 до 240 кД. X-фрагменты могут полимеризоваться под действием тромбина, хотя и с меньшей скоростью, чем нативный фибриноген.

Полная потеря свертываемости происходит после отщепления одного из D-фрагментов, содержащего периферический участок полимеризации. Далее Y-фрагмент может расщепляться на начальные D- и E-фрагменты, которые после отщепления нескольких коротких пептидов превращаются в конечные фрагменты с молекулярной массой 80 кД (D-фрагмент) и 50 кД (E-фрагмент).

Расщепление связей в сшитом фибрине происходит примерно в том же порядке, как и при расщеплении фибриногена, а конечные продукты расщепления — E-фрагменты и D-димер. D-ди-

мер состоит из 2 ковалентно связанных D-фрагментов, принадлежавших смежным молекулам фибрин-мономеров в полимере. В плазме растворимые фрагменты фибрина могут представлять собой набор фрагментов, состоящих из D-димера, связанного ковалентно или нековалентно с E-фрагментами.

АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА

Тканевый активатор плазминогена (тАП) синтезируется клетками эндотелия и секретируется как одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой 70 кД. В препаративных количествах тАП может быть выделен из культуры клеток меланомы.

При хроматографии на Lys-сефарозе тАП разделяется на 2 формы — типы I и II, отличающиеся по содержанию углеводов. Участки гликозилирования — Asn в положениях 117, 184 (только при типе I) и 448. С Asn₁₁₇ связан линейный олигосахарид, состоящий из остатков маннозы. Два других участка содержат разветвляющиеся до 4 цепочек олигосахариды, содержащие остатки N-ацетиллактозамина. Степень гликозилирования тАП влияет на кинетику активации Пг. Удельная активность тАП типа I в ~1,5 раза выше, чем активность тАП типа II.

Третичная структура тАП состоит из пальцевидного домена фибронектина, домена фактора роста эпидермиса, 2 крингл-доменов и протеазного домена. Домен фибронектина и крингл-2 содержат участки связывания тАП с фибрином. Активный центр образуют остатки His₃₂₂, Asp₃₇₁ и Ser₄₇₈. Плазмин, калликреин и фактор X_a специфически расщепляют тАП по Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ с образованием активатора, состоящего из 2 цепочек, соединенных дисульфидным мостиком. Физиологическое значение превращения тАП в двухцепочечную форму неизвестно. В отсутствие фибрина двухцепочечный тАП активирует Пг с несколько большей скоростью, чем одноцепочечный, но в присутствии фибрина активаторные свойства двух форм тАП практически не различаются.

Свободный Пг активируется тАП с очень низкой скоростью. Реакция характеризуется низкой величиной k_{cat} и значением K_m , более чем на порядок превышающим концентрацию Пг в крови. Фибрин связывает тАП и Пг. Образование комплекса фибрин-

тАП–Пг на 3 порядка увеличивает каталитическую эффективность активации Пг. В процессе разрушения фибрина плазмином на нем экспонируются новые участки связывания Пг с высоким сродством и наблюдается дальнейшее увеличение скорости активации Пг.

тАП обладает коротким $t_{1/2}$ в кровотоке. Основной орган, обеспечивающий выведение тАП, — печень. При прохождении через печень из крови удаляется 70% активатора. Исследование динамики тАП в крови после внутривенной инфузии показало, что выведение активатора из кровотока характеризуется наличием двух фаз с $t_{1/2}$ около 3 и 30 мин. Предполагается, что фаза быстрого снижения концентрации тАП обусловлена его клиренсом клетками печени и обратимым связыванием с эндотелием, а фаза медленного снижения — поступлением в кровь активатора, депонированного ранее на эндотелии.

Несколько типов рецепторов могут участвовать в связывании и интернализации тАП. В печени эндотелиальные клетки и клетки Купфера связывают преимущественно свободную форму тАП и взаимодействие с их рецепторами обеспечивается остатками маннозы углеводной цепи, связанной с Asn₁₁₇ первого кринг-домена. Клетки паренхимы содержат Ca²⁺-зависимый рецептор, взаимодействующий с EGF-доменом тАП. Рекомбинантные формы тАП, в которых удалены 3 N-концевых домена или изменено положение участка гликозилирования, выводятся из кровотока в несколько раз медленнее, чем природная форма тАП.

Гепатоциты содержат рецептор, гомологичный рецептору липопротеинов низкой плотности, который связывает как свободный тАП, так и его комплекс с ингибитором. Этот рецептор участвует в связывании и интернализации также и других протеаз, инактивированных α_2 -МГ. Он состоит из 2 полипептидных цепей с молекулярной массой 515 и 85 кД. С рецептором взаимодействует еще один белок, имеющий молекулярную массу 39 кД. Лигандсвязывающие участки находятся на субъединице с молекулярной массой 515 кД, располагающейся на поверхности клеток и взаимодействующей с субъединицей с молекулярной массой 85 кД, обладающей трансмембранным и цитоплазматическим доменами. тАП и комплекс тАП–ИАП-1 связываются, по-видимому, с разными участками рецептора, так как белок

с молекулярной массой 39 кД ингибирует в большей степени связывание комплекса, чем свободного тАП.

Многие типы клеток специфически связывают Пг со сродством ~ 1 мкМ. Рецепторы тАП на мембранах клеток, а также такие белки межклеточного матрикса, как тромбоспондин, желатин и коллаген IV типа могут стимулировать активацию связанного с мембранами Пг под действием тАП, но их кофакторная активность значительно меньше, чем у фибрина.

Урокиназа. Трипсиноподобная протеаза, активирующая Пг, впервые была выделена из мочи и названа урокиназой. Выделенный фермент состоял из 2 субъединиц, соединенных дисульфидным мостиком. Вскоре было показано, что клетки секретируют урокиназу в виде одноцепочечного белка, который не расщепляет синтетические субстраты и не взаимодействует с ацилирующими реагентами. Это послужило основанием для названия данной формы фермента проурокиназой.

При инкубации Пг с одноцепочечной урокиназой происходит взаимная активация проферментов. Кинетический анализ показал, что образование двухцепочечной урокиназы и плазмина может быть описано моделью, включающей 3 последовательные реакции: активацию Пг одноцепочечной урокиназой; превращение образующимся плазмином одноцепочечной урокиназы в двухцепочечную; активацию Пг двухцепочечной урокиназой. Связывание Пг с одноцепочечной урокиназой может приводить к конформационным изменениям, в результате которых формируется активный центр, обеспечивающий начальную активацию Пг. В пользу этого свидетельствует то, что способностью активировать Пг обладает рекомбинантная форма активатора, которая в результате замены Lys₁₅₈ Glu не расщепляется плазмином на двухцепочечную. Таким образом, одноцепочечная урокиназа, по-видимому, — не истинный профермент, и Международный комитет по тромбозу и гемостазу рекомендовал заменить термин «проурокиназа» на «одноцепочечный активатор Пг урокиназного типа» (оцу-АП).

оцу-АП секретируется клетками как белок с молекулярной массой 54 кД, состоящий из 411 аминокислотных остатков. Вторичная структура состоит из 3 участков, включающих крингл-

и каталитический домен. Активный центр образуют остатки His₂₀₄, Asp₂₅₅ и Ser₃₅₆.

Ряд связей в структуре оцу-АП легко подвергается протеолизу, что обуславливает наличие нескольких изоформ фермента. Из культуры клеток аденокарциномы человека выделена низкомолекулярная (32 кД) форма, которая может образоваться в результате расщепления связи Glu₁₄₃-Leu₁₄₄. По ферментативным свойствам эта форма практически не отличается от нативного оцу-АП. Плазмин и калликреин расщепляют связь Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ с образованием двухцепочечной формы фермента (дцу-АП), в котором легкая (N-концевая) и тяжелая (C-концевая) цепи связаны дисульфидным мостиком. Плазмин может далее расщеплять и связь Lys₁₃₅-Lys₁₃₆ с образованием низкомолекулярной формы (33 кД), не содержащей регуляторных доменов. В коммерческих препаратах дцу-АП обнаружена форма, которая может образоваться также в результате расщепления связи Phe₁₅₇-Lys₁₅₈.

Тромбин специфически расщепляет Arg₁₅₆-Phe₁₅₇ с образованием двухцепочечной формы, не активирующей Пг *in vitro*, но обладающей заметной тромболитической активностью *in vivo*. Плазмин может, хотя и с очень низкой скоростью, расщеплять в этой форме связь Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ с образованием активного дцу-АП.

N-концевая аминокислота тяжелой цепи имеет важное значение в проявлении протеолитической активности дцу-АП. Добавление аминокислот с N-конца или даже консервативная замена Ile₁₅₉ приводит к резкому снижению способности дцу-АП активировать Пг. Предполагается, что этот остаток после расщепления связи Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ перемещается в область субстратсвязывающего центра и принимает участие в его формировании.

оцу-АП не обладает высоким сродством к фибрину, но при внутривенном введении вызывает лизис тромбов без выраженной активации Пг в кровотоке. Селективность действия оцу-АП может быть обусловлена: образованием в плазме обратимого комплекса с ингибитором, диссоциирующего при взаимодействии оцу-АП с Пг, связанным с фибрином; локальной активацией оцу-АП на поверхности тромба калликреином, фактором XII_a или плазмином; включением в тромб ряда белков плазмы и клеток крови, взаимодействие которых может приводить к форми-

рованию уникальной структуры, обеспечивающей высокое сродство к оцу-АП и увеличение его активности даже без превращения в дцу-АП. Подтверждением этой точки зрения может служить то, что резистентный к расщеплению плазмином оцу-АП и форма, расщепленная тромбином, обладают намного большей активностью в лизисе тромбов, чем можно было бы ожидать, исходя из кинетики активации *Pr in vitro*.

Урокиназа синтезируется различными типами клеток: фибробластами, эпителиальными клетками, пневмоцитами, децидуальными клетками плаценты, макрофагами, а также эндотелиальными клетками под воздействием различных стимулов. Многие типы клеток обладают специфическим рецептором к урокиназе (у-АПР). у-АПР — богатый цистеином гликопротеин, не имеющий трансмембранного и внутриклеточного доменов. Взаимодействие с мембраной клетки обеспечивается ковалентной связью С-конца с гликозилфосфатидилинозитолом. Связывание урокиназы с у-АПР обеспечивается N-концевым EGF-доменом и характеризуется высоким сродством ($K_d \sim 10^{-9} - 10^{-10}$ М) и специфичностью. Другие EGF-содержащие компоненты системы гемостаза с этим рецептором не взаимодействуют. Связывание урокиназы с у-АПР активирует сигналпроводящую систему, дифференциацию клеток, хемотаксис нейтрофилов и миграцию клеток эндотелия. Связанная с рецептором урокиназа активирует Пг и латентные металлопротеазы в межклеточном пространстве, что обеспечивает разрушение внеклеточного матрикса, необходимое для роста, деления и миграции клеток. Повышенное содержание урокиназы, ее рецепторов и ИАП-1 в клетках опухолей ассоциируется с ростом и метастазированием опухолей и плохим прогнозом заболевания.

ИНГИБИТОРЫ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

тАП непрерывно секретируется эндотелием как активный фермент, но в крови он быстро инактивируется. Наиболее эффективный ингибитор тАП и урокиназы — белок из семейства серпинов, получивший название ингибитора активаторов Пг типа 1 (ИАП-1). Ингибитор активаторов Пг типа 2 (ИАП-2), инактивирующий с высокой скоростью урокиназу, синтезируется

плаценты, моноцитами и макрофагами. В норме в крови он не обнаруживается, но при беременности и ряде заболеваний его содержание в плазме может значительно возрасти. Ингибиторы, первоначально описанные как ИАП-3 и ИАП-4, впоследствии были идентифицированы как ингибитор PrC_a и протеазный ингибитор-1 соответственно.

ИАП-1 — гликопротеин с молекулярной массой 52 кД, состоящий из 379 аминокислотных остатков. Основное место синтеза ИАП-1 — эндотелий сосудов. ИАП-1 может синтезироваться также гепатоцитами, моноцитами, фибробластами, клетками меланомы и ГМК. Значительное количество ИАП-1 (~90% от общего пула крови) содержится в α -гранулах тромбоцитов и секретируется из них при активации, что может создавать высокую локальную концентрацию ИАП-1 и играть важную роль в стабилизации фибриновой матрицы тромба.

ИАП-1 может находиться в активной и латентной формах, переход между которыми не связан с протеолизом и обратим. *In vitro* латентный ИАП-1 активируется обработкой хаотропными реагентами. Физиологический механизм активации латентного ИАП-1 неизвестен. Предполагается, что негативно заряженные фосфолипиды, экспонирующиеся на поверхности активированных тромбоцитов, могут активировать латентный ИАП-1. В плазме активная форма ИАП-1 связывается с витронектином, стабилизирующим активную конформацию ИАП-1. Витронектин обеспечивает также связывание ИАП-1 с внеклеточным матриксом.

Взаимодействие ИАП-1 с активаторами протекает в две стадии. Вначале быстро ($k_{\text{cat}} \sim 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) образуется обратимый комплекс, в котором происходит расщепление связи $\text{Arg}_{346}\text{--Met}_{347}$ реактивного центра с освобождением С-концевого пептида ингибитора и образованием ковалентного комплекса активатор–ИАП-1. Комплекс тАП–ИАП-1 может связываться с фибрином и быть конкурентным ингибитором взаимодействия тАП с фибрином.

Повышение активности ИАП-1 — наиболее часто встречающаяся причина снижения фибринолитической активности крови. Анализ соотношения между содержанием в плазме тАП, его активностью и активностью ИАП-1 показал, что доля активно-

го тАП экспоненциально снижается при линейном увеличении активности ИАП-1. При активности ИАП-1 менее 7 МЕ/мл около 33% секретируемого эндотелием тАП находится в активном состоянии, а при активности ИАП-1 более 22 МЕ/мл на долю активного тАП приходится лишь 1,5%. Прямое доказательство того, что повышение ИАП-1 может приводить к патологическому тромбообразованию, получено в экспериментах с трансгенными мышами, у которых венозные тромбозы развивались при повышении экспрессии гена ИАП-1 и исчезали после ее подавления. Гетерозиготная форма врожденного дефицита ИАП-1 протекает бессимптомно, а у гомозигот наблюдаются медленное заживление ран и повышенная кровоточивость после травм.

В промоторном участке гена ИАП-1 обнаружен 4G/5G-полиморфизм, который влияет на скорость транскрипции. В популяции встречаемость генотипов 4G/4G, 4G/5G и 5G/5G соответствует 0,25, 0,5 и 0,25. Уровень ИАП-1 в плазме у 4G/4G-гомозигот на ~30% выше, чем у 5G/5G. Активность ИАП-1 в плазме подвержена циркадным изменениям в течение дня с максимумом в утренние часы и в течение года с максимумом в зимние месяцы. ИАП-1 — один из компонентов системы гемостаза, определяющих утреннюю гиперкоагуляцию.

ИАП-1 — один из наиболее быстро реагирующих белков острой фазы. Его активность в плазме может значительно повышаться при многих заболеваниях. Синтез ИАП-1 стимулируется эндотоксином, цитокинами, факторами роста, а также тромбином, тАП и ангиотензином II.

Данные проспективных исследований свидетельствуют о том, что повышение активности ИАП-1 и/или снижение активности тАП связано с риском развития инфаркта миокарда у больных с нестабильной стенокардией, повторного инфаркта миокарда в молодом возрасте и рестенозов после ангиопластики. В то же время необходимо отметить, что при многофакторном анализе значимость ИАП-1 как фактора риска снижается, что отражает его взаимосвязь с другими факторами риска заболеваний ССС. Уровень ИАП-1 в плазме коррелирует с концентрацией инсулина, индексом массы тела, повышением уровня ТГ и снижением содержания ЛПВП, которые характерны для синдрома резистентности к инсулину.

следовании факторов риска атеросклероза повышение соотношения тАП и Аг ассоциировалось с появлением его ранних признаков.

В ряде исследований были обнаружены повышение уровня Аг и тАП у больных с тромбозами и наличие отрицательной корреляции между концентрацией Аг и активностью тАП в плазме больных. Предполагается, что повышение уровня Аг и тАП может быть обусловлено увеличением скорости ингибирования тАП в кровотоке и накоплением комплекса тАП–ИАП-1, клиренс которого клетками печени осуществляется медленнее, чем свободного тАП.

СТРЕПТОКИНАЗА

В 1933 г. было обнаружено, что культура β -гемолитического стрептококка продуцирует соединение, вызывающее лизис сгустков крови. Это соединение получило первоначальное название «фибринолизин». Впоследствии оказалось, что для лизиса фибрина под действием стрептококков необходим еще и плазменный фактор. Этот фактор был назван Пг, а фибринолизин переименован в стрептокиназу (СК). В конце 50-х годов были получены высокоочищенные препараты СК и началось ее применение для растворения внутрисосудистых тромбов, открывшее эру тромболизиса.

СК — однопепочный белок с молекулярной массой 47 кД и состоящий из 386 аминокислотных остатков. СК не имеет собственной ферментативной активности*, а ее эффективность как стимулятора фибринолиза значительно варьирует у животных разных видов. Механизм стимуляции фибринолиза в плазме человека заключается в образовании с высокой скоростью ($k_{\text{ass}} \sim 10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$) стехиометрического комплекса СК–Пг ($K_d \sim 10^9 \text{ М}^{-1}$), в котором в результате конформационных изменений в Пг формируется активный центр протеазы. Ферментативные свойства комплекса СК–Пг существенно отличаются от таковых плазмина: комплекс служит активатором Пг, а плаз-

* Характерное для ферментов название было дано задолго до того, как был выяснен механизм действия этого белка.

следовании факторов риска атеросклероза повышение соотношения тАП и Аг ассоциировалось с появлением его ранних признаков.

В ряде исследований были обнаружены повышение уровня Аг и тАП у больных с тромбозами и наличие отрицательной корреляции между концентрацией Аг и активностью тАП в плазме больных. Предполагается, что повышение уровня Аг и тАП может быть обусловлено увеличением скорости ингибирования тАП в кровотоке и накоплением комплекса тАП–ИАП-1, клиренс которого клетками печени осуществляется медленнее, чем свободного тАП.

СТРЕПТОКИНАЗА

В 1933 г. было обнаружено, что культура β -гемолитического стрептококка продуцирует соединение, вызывающее лизис сгустков крови. Это соединение получило первоначальное название «фибринолизин». Впоследствии оказалось, что для лизиса фибрина под действием стрептококков необходим еще и плазменный фактор. Этот фактор был назван Пг, а фибринолизин переименован в стрептокиназу (СК). В конце 50-х годов были получены высокоочищенные препараты СК и началось ее применение для растворения внутрисосудистых тромбов, открывшее эру тромболизиса.

СК — одноцепочечный белок с молекулярной массой 47 кД и состоящий из 386 аминокислотных остатков. СК не имеет собственной ферментативной активности*, а ее эффективность как стимулятора фибринолиза значительно варьирует у животных разных видов. Механизм стимуляции фибринолиза в плазме человека заключается в образовании с высокой скоростью ($k_{ass} \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) стехиометрического комплекса СК–Пг ($K_d \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$), в котором в результате конформационных изменений в Пг формируется активный центр протеазы. Ферментативные свойства комплекса СК–Пг существенно отличаются от таковых плазмينا: комплекс служит активатором Пг, а плаз-

мин — нет; комплекс СК–Пг инактивируется α_2 -АП и α_2 -МГ с очень низкой скоростью; комплекс СК–Пг не обладает способностью прямо расщеплять фибрин. После образования комплекса СК–Пг в нем происходит расщепление как Пг с образованием Lys–Пг и плазмина, так и укороченных форм СК:



Все эти комплексы обладают способностью активировать Пг, однако по мере накопления расщепленных форм снижается потенцирующее влияние фибрина на активацию Пг и увеличивается скорость инактивации ингибиторами плазмы.

Повышения тромболитической эффективности СК удалось достичь путем создания препаратов (APSAC, Eminase), представляющих собой эквимольные комплексы СК–Пг/Пл, в которых Ser активного центра протеазы ацилирован. Эта модификация не влияет на структуру крингл-доменов Пг, и ацилированный комплекс связывается с достаточно высоким сродством ($K_d \sim 10$ мкМ) с фибрином. Скорость деацилирования определяется химической структурой ацила и для р-анизойловых производных $t_{1/2}$ составляет ~ 100 мин. Фармакокинетические исследования показали, что $t_{1/2}$ APSAC в кровотоке больше, чем СК, и составляет ~ 90 мин. Большее $t_{1/2}$ и наличие сродства к фибрину способствуют накоплению активатора в области тромба, а относительно медленное восстановление ферментативной активности позволяет применять болюсное введение препарата больным.

2.4. РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ И СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ В ПАТОГЕНЕЗЕ АРТЕРИАЛЬНОГО ТРОМБОЗА

Тромботические осложнения заболеваний ССС — наиболее частая причина смерти в современном обществе. В частности, различные проявления острой коронарной патологии в странах западной Европы и США ежегодно уносят почти 1 млн жизней, поэтому неудивительно, что классические представления о патогенезе артериального тромбоза получены на основании экспериментального, морфологического и клинического изучения тромбоза коронарных артерий.

Причина развивающегося инфаркта миокарда — внутрикоронарный тромбоз, возникающий, как правило, на месте имеющейся атеросклеротической бляшки с поврежденной поверхностью. Доказательствами этому положению послужили исследования английских морфологов Дэвиса и Томаса (1984), обнаруживших в 74 из 100 вскрытий умерших от ИБС в первые 6 ч от начала симптомов внутрисосудистый тромбоз. Причем все тромбы наблюдались в местах разрывов богатых липидами атеросклеротических бляшек, в значительном проценте случаев тромботические массы проникали через трещину внутрь бляшки и тем самым увеличивали ее размеры.

Фальк (1983), изучая патологоанатомический материал внезапно умерших больных нестабильной стенокардией, практически во всех случаях обнаружил внутрикоронарный тромбоз, причем в 81% случаев тромбы располагались в местах разрывов атеросклеротических бляшек, имели слоистую структуру, что указывало на разный «возраст» тромботических масс, постепенно суживавших просвет коронарной артерии.

Совершенствование ангиографического оборудования, многочисленные ангиографические исследования больных инфарктом миокарда и нестабильной стенокардией без лечения и с введением тромболитических препаратов и, наконец, создание коронароангиоскопических катетеров позволили визуализировать внутреннюю оболочку коронарных артерий и подтвердить патогномоничность внутрикоронарного тромбоза при инфаркте миокарда и нестабильной стенокардии.

Артериальные тромбы состоят в основном из тромбоцитов с небольшим содержанием фибрина и эритроцитов, поэтому их условно называют белыми тромбами в отличие от венозных, так называемых красных тромбов, состоящих преимущественно из эритроцитов и фибриновых нитей. Различия в венозных и артериальных тромбах относительны. Состав тромба определяется его «возрастом».

Атеросклеротическая бляшка — основной элемент атеросклероза. Начальные стадии ее образования связаны с накоплением липидов в макрофагах и в свободном состоянии в тканях, с пролиферацией ГМК и образованием коллагена. Вследствие этих процессов образуется атеросклеротическая бляшка с ядром,

в котором содержатся внеклеточные липиды. Ядро заключено в фиброзную коллагеновую капсулу. Помимо свободного холестерина, в ядре содержатся пенистые клетки — «нафаршированные» липидами макрофаги. Макрофаги разрушаются, и их липидное содержимое увеличивает ядро бляшки. Небольшие атеросклеротические бляшки часто не видны при коронароангиографии, так как коронарные сосуды способны к ремоделированию. Ишемия миокарда и ее клиническое проявление (стенокардия) появляются, когда бляшка увеличивается настолько, что артерия теряет способность к ремоделированию и возникает хронический стеноз коронарной артерии. Второй возможный вариант развития процесса — быстрое образование тромба на бляшке, и именно это приводит к развитию так называемого острого коронарного синдрома, к клиническим проявлениям которого относят нестабильную стенокардию и инфаркт миокарда. Выделение острого коронарного синдрома связано с тем, что при указанных клинических состояниях отмечают общие морфологические признаки в виде поврежденной атеросклеротической бляшки с разрывами ее поверхности и формированием внутрикоронарного тромбоза.

Тромбообразование на бляшке начинается вследствие истончения и повреждения покрывающего ее эндотелия, при этом тромб располагается на поверхности бляшки. Вторая причина — разрыв покрывки бляшки с обнажением липидного ядра, при этом тромб формируется внутри бляшки, приводя впоследствии к сужению сосуда. При анализе летальных исходов, причиной которых был тромбоз коронарных артерий, Дэвис в 1990 г. показал, что только в 25% случаев тромбоз связан с эрозией эндотелия, а в остальных — с разрывом бляшек. Есть данные, что эрозии эндотелия чаще возникают у женщин.

Таким образом, разрыв атеросклеротической бляшки можно считать составной частью атеросклеротического процесса и важным стимулом для развития тромбоза. Множество факторов контролируют процесс тромбообразования: местный кровоток, врожденные особенности организма, состояние фибринолиза и свертывающей системы крови больного, стадия развития атеросклеротической бляшки.

Участие тромбоцитов в развитии атеросклеротического процесса подтверждается тем, что фибрин и компоненты тромбо-

цитов находят внутри бляшки. Смит и Степлз, используя иммуногистохимические методы, обнаружили в бляшке поперечно-сшитый фибрин, протромбин и продукт секреции тромбоцитов — β -тромбоглобулин. Кроме того, похоже, что тромбоциты могут стимулировать рост и пролиферацию компонентов атеросклеротической бляшки, выделяя так называемый тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β) и другие низкомолекулярные субстанции. Особенно важным представляется роль PDGF, так как известно, что он стимулирует рост и пролиферацию ГМК и фибробластов — основу фиброзной ткани внутри атеросклеротической бляшки. Взаимодействие между тромбоцитами и сосудистым эндотелием влияет на рост атеросклеротической бляшки, определяющим фактором которого служит повреждение эндотелия. В 1995 г. Кровелло и соавт. установили, что адгезивная молекула Р-селектина принимает участие в адгезии тромбоцитов, поврежденного эндотелия и лейкоцитов. Установлено, что взаимодействие молекулы Р-селектина с рецептором моноцита инициирует образование цитокинов и тканевого фактора, т.е. моноциты могут принимать участие в развитии атеросклеротической бляшки, не только накапливая липиды и превращаясь в пенистые клетки, но и образуя цитокины, а также активируя каскад коагуляции путем тромбинообразования.

Разрывы мелких бляшек приводят к проникновению тромбоцитарных масс внутрь бляшки, стимуляции пролиферации ГМК и дальнейшему росту бляшки. Данный механизм лежит в основе развития хронических стенозов и приводит к формированию стабильной стенокардии.

Выраженность стеноза в коронарной артерии — важный фактор, определяющий клинические проявления разрывов бляшек. Дэвис в 1990 г. показал, что у 81% больных, умерших от тромбоза, развившегося в месте эрозированного эндотелия, были гемодинамически значимые стенозы (60%). С другой стороны, среди лиц, умерших от тромбоза коронарной артерии, развившегося на месте лопнувшей бляшки или изъязвленного поражения, больше половины (60%) имели гемодинамически незначимые (менее 60%) стенозы в коронарных артериях. Эти морфологические данные соответствуют клинико-ангиографическим

наблюдениям, подтверждающим, что возникновение нестабильной стенокардии связано с ростом бляшек в местах умеренных стенозов (Амброуз, 1988). Разрыв бляшек в местах выраженных стенозов не сказывается на коронарном кровотоке, так как длительно существующий стеноз в коронарной артерии способствует развитию коллатерального кровообращения. С другой стороны, разрыв бляшек, умеренно стенозирующих коронарные артерии, чаще проявляется симптомами острого коронарного синдрома из-за отсутствия развитого коллатерального русла.

Форма бляшки также определяет прогрессирование ИБС. Бляшки бывают концентрическими, вызывающими фиксированную степень стеноза коронарной артерии, и эксцентрическими, при которых степень стенозирования может варьировать. Большинство больных ИБС имеют бляшки разной формы. При исследовании коронарного русла у больных стабильной стенокардией соотношение концентрических и эксцентрических бляшек составляет соответственно 76 и 24%. Общеизвестно, что при остром коронарном синдроме эксцентрические стенозы отмечают чаще.

Атеросклеротические бляшки отличаются и по составу. Фиброзные (стабильные) состоят в основном из коллагена и протеогликанов. Они составляют до 60% у больных стабильной стенокардией.

Богатые липидами или уязвимые (ранимые) бляшки содержат липидное ядро, отделенное от кровотока тонкой фиброзной капсулой. Скопление липидов часто содержит коллаген, придающий стабильность фиброзной капсуле. У больных, умерших от острого коронарного синдрома, анализ лопнувших бляшек показал наличие в них внеклеточных липидов и сниженное содержание коллагена. В бляшках, где липидное ядро не было нарушено, разрывы наблюдались между слоями коллагена фиброзной капсулы. Бляшки с высоким содержанием липидов предрасполагают к более агрессивному течению ИБС.

Прочность фиброзной капсулы, отделяющей насыщенное липидами ядро от потока крови, зависит от ее толщины. Бляшки с толстой капсулой более устойчивы к разрывам и соответственно к переходу болезни в острый коронарный синдром. Основные составляющие фиброзной капсулы — коллаген и эластин.

Нарушение синтеза коллагена или усиление его распада может способствовать истончению фиброзной капсулы.

Таким образом, разрыв капсулы или нарушение целостности эндотелия, покрывающего уязвимую, насыщенную липидами, незначительно стенозирующую просвет коронарной артерии атеросклеротическую бляшку, — общий первый шаг, приводящий к дестабилизации ИБС. Разрыв бляшки — триггерный механизм для образования богатого тромбоцитами тромба, играющего важную роль в патогенезе острого коронарного синдрома.

Разрыв бляшки приводит к экспонированию тромбогенных субстанций субэндотелиальных слоев. В нагруженных липидами макрофагах образуется большое количество тканевого фактора (ТФ) — мощного стимулятора тромбообразования. ТФ — низкомолекулярный гликопротеин. На нормальном эндотелии он не экспрессируется, но его большое количество содержится в клетках, представляющих собой содержимое атеросклеротической бляшки, включая макрофаги, ГМК и поврежденные эндотелиальные клетки. ТФ находят также и в адвентиции артерий. Фибриновые и тромбоцитарные скопления в большей степени выражены в богатом липидами ядре бляшки и в местах изъязвлений и разрывов бляшек. ТФ образует комплекс с фактором VII свертывания крови, создавая так называемый комплекс активированный фактор VII–ТФ. Этот комплекс, экспонированный на липидном ядре, активирует фактор X свертывания крови, который в свою очередь инициирует каскад коагуляции, в результате чего образуется тромбин — ключевой фермент свертывания, превращающий фибриноген в фибрин. Но функции тромбина не ограничиваются ключевой реакцией системы свертывания; он активирует противосвертывающую систему, связываясь с тромбомодулином, экспонированном на эндотелии, а также активирует тромбоциты, связываясь с рецептором I_b . Тромбин — мощнейший индуктор агрегации тромбоцитов. Еще одним сильным стимулятором адгезии и агрегации тромбоцитов, содержащимся как в субэндотелиальных слоях, так и внутри бляшки, служит коллаген. Функцию адгезивного белка выполняет фФВ, присутствующий как в плазме, так и в субэндотелиальных структурах, однако неактивированные тромбоциты могут взаимодействовать только с субэндотелиальной формой фФВ. Разрыв бляшки при-

водит к экспонированию субэндотелиального фФВ, что способствует первому этапу образования тромбоцитарного тромба, — адгезии тромбоцитов. Адгезия тромбоцитов происходит вследствие связывания фФВ с рецептором мембраны тромбоцитов гликопротеином I_b.

Фактор VIII (фФВ) — многомерный белок плазмы, индуцирующий прилипание тромбоцитов к субэндотелиальным структурам. фФВ, помимо ключевой роли в адгезии и агрегации тромбоцитов, участвует в образовании тромба и процессах коагуляции и служит защитным белком для фактора VIII свертывания крови. За последние годы достигнуты большие успехи в изучении фФВ. Расшифрована структура белка фФВ, идентифицирован его функциональный домен, определены мутации, приводящие к вариантам фФВ. Ген фФВ расположен в 12-й паре хромосом. фФВ имеет в своей структуре цепочку Arg-Gly-Asp; это соединение находят в структуре многих адгезивных белков, которые способны взаимодействовать с так называемыми интегриновыми рецепторами. фФВ синтезируется исключительно в мегакариоцитах, в эндотелиальных клетках, находят его и в α -гранулах тромбоцитов, в плазме и субэндотелиальном пространстве. В эндотелиальных клетках фФВ находится в тельцах Вайбеля-Паладе и выделяется из них под воздействием различных физиологических стимулов. Основное количество фФВ находится в эндотелии, субэндотелии и тромбоцитах, поэтому его содержание в плазме непостоянно. фФВ выделяется в кровоток в месте и в момент повреждения эндотелия и, таким образом, участвует в регуляции гемостаза.

фФВ имеет две основные функции. Первая — связывание и стабилизация фактора VIII *in vivo* и *in vitro* (защита фактора VIII от инактивации протеином С и фактором X_a); вторая — обеспечение связей между тромбоцитами и сосудистой стенкой (адгезия тромбоцитов) и тромбоцитами (агрегация тромбоцитов).

фФВ взаимодействует с компонентами субэндотелия и клеточными рецепторами при высоких скоростях сдвига, т. е. в мелких сосудах и стенозированных артериях. В этих местах это единственный белок, осуществляющий адгезию.

Установлено, что у больных атеросклерозом и такими заболеваниями, как артериальная гипертензия, сахарный диабет,

и арахидонового каскада с образованием тромбоксана A_2 — мощного индуктора активации тромбоцитов. Секреция из гранул тромбоцитов биологически активных веществ получила название реакции освобождения, в результате которой в процесс агрегации вовлекаются новые тромбоциты; процесс становится самоподдерживающимся и заканчивается формированием первичного тромбоцитарного тромба. Агрегация тромбоцитов завершается путем формирования мостиков между адгезивными белками (фибриноген, фФВ) и активированными рецепторами II_b/III_a тромбоцитов. Этот конечный этап агрегации тромбоцитов одинаков при всех возможных видах их стимуляции.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ТРОМБОЦИТОВ

Рецепторы тромбоцитов — гликопротеины мембраны, большинство из которых относят к семейству так называемых интегринов. Интегрины — гетеродимерные молекулы, состоящие из семейства α - и β -субъединиц, различные комбинации которых и служат специфическими рецепторами для различных лигандов. Интегрины находят на поверхностях практически всех клеток, они участвуют во многих физиологических реакциях. Известно несколько интегринов, участвующих в адгезии тромбоцитов: гликопротеин I_a/II_a ($\alpha_2\beta_1$) — основной рецептор для коллагена, гликопротеин I_c/II_a ($\alpha_5\beta_1$) — для фибронектина, $\alpha_6\beta_1$ — рецептор для ламинина, $\alpha_5\beta_3$ — рецептор для витронектина. Последний рецептор способен узнавать и другие лиганды: фибриноген, фФВ, связывающиеся и с рецептором II_b/III_a . Известно несколько рецепторов, по структуре не относящихся к интегринам, участвующих в адгезии тромбоцитов: гликопротеин IV — рецептор для коллагена и тромбоспондина, а также гликопротеин I_b , связывающий фФВ.

Таким образом, за процесс адгезии тромбоцитов ответственно несколько рецепторов мембраны тромбоцитов, среди которых есть представители семейства интегринов и других семейств. Однако основной рецептор, узнающий наибольшее количество лигандов, а именно фибриноген, фибронектин, фФВ и витронектин и участвующий в процессе агрегации, — гликопротеин II_b/III_a ($\alpha_2\beta_3$) поверхностной мембраны тромбоцитов.

II_b/III_a-рецептор тромбоцитов — типичный представитель семейства интегринов. Его α-субъединица, или гликопротеин II_b (молекулярная масса 36 кД), состоит из тяжелой и легкой цепей. Легкая цепь имеет короткий цитоплазматический хвост, трансмембранную часть и короткий внеклеточный домен. Тяжелая цепь расположена снаружи клетки. β-Субъединица, или гликопротеин III_a (молекулярная масса 92 кД), состоит из единственного полипептида (762 аминокислоты) с коротким цитоплазматическим хвостом, трансмембранной частью и большим внеклеточным доменом. Субъединицы нековалентно связаны друг с другом, для сохранения гетеродимерной структуры необходим кальций. II_b/III_a-рецепторы наиболее распространены, на поверхности одного тромбоцита содержится примерно 50 000 рецепторов. II_b/III_a-рецепторы тромбоцитов изучены в наибольшей степени благодаря проведению исследований по изучению тромбастении Глянцмана — врожденной патологии, связанной с отсутствием или резким снижением количества II_b/III_a-рецепторов. Исследования крови больных с тромбастенией Глянцмана показали, что II_b/III_a-рецепторы способны связываться не только с фибриногеном и тем самым осуществлять процесс агрегации тромбоцитов, но и с другими адгезивными гликопротеинами: фибронектином, фФВ, витронектином, в большей степени отвечающими за адгезию тромбоцитов к субэндотелиальным структурам.

Механизм действия II_b/III_a-рецептора заключается в его способности узнавать 2 характерные аминокислотные последовательности. Первая состоит из аминокислот Arg–Gly–Asp, она обнаружена в фибронектине, фФВ, витронектине, а также и в α-цепях молекул фибриногена, причем на каждую половину молекулы фибриногена приходится по 2 ключевые последовательности Arg–Gly–Asp. Следует подчеркнуть, что ключевая последовательность Arg–Gly–Asp узнаваема большинством представителей семейства интегринов. Тонкие механизмы взаимодействия II_b/III_a-рецепторов с адгезивными молекулами до конца не изучены, но очевидно, что пептиды или мелкие молекулы, содержащие ключевую последовательность аминокислот Arg–Gly–Asp, могут быть потенциальными ингибиторами взаимодействия II_b/III_a-рецепторов тромбоцитов с фибриногеном.

II_b/III_a -рецептор тромбоцитов — типичный представитель семейства интегринов. Его α -субъединица, или гликопротеин II_b (молекулярная масса 36 кД), состоит из тяжелой и легкой цепей. Легкая цепь имеет короткий цитоплазматический хвост, трансмембранную часть и короткий внеклеточный домен. Тяжелая цепь расположена снаружи клетки. β -Субъединица, или гликопротеин III_a (молекулярная масса 92 кД), состоит из единственного полипептида (762 аминокислоты) с коротким цитоплазматическим хвостом, трансмембранной частью и большим внеклеточным доменом. Субъединицы нековалентно связаны друг с другом, для сохранения гетеродимерной структуры необходим кальций. II_b/III_a -рецепторы наиболее распространены, на поверхности одного тромбоцита содержится примерно 50 000 рецепторов. II_b/III_a -рецепторы тромбоцитов изучены в наибольшей степени благодаря проведению исследований по изучению тромбастении Глянцмана — врожденной патологии, связанной с отсутствием или резким снижением количества II_b/III_a -рецепторов. Исследования крови больных с тромбастенией Глянцмана показали, что II_b/III_a -рецепторы способны связываться не только с фибриногеном и тем самым осуществлять процесс агрегации тромбоцитов, но и с другими адгезивными гликопротеинами: фибронектином, фФВ, витронектином, в большей степени отвечающими за адгезию тромбоцитов к субэндотелиальным структурам.

Механизм действия II_b/III_a -рецептора заключается в его способности узнавать 2 характерные аминокислотные последовательности. Первая состоит из аминокислот Arg-Gly-Asp, она обнаружена в фибронектине, фФВ, витронектине, а также и в α -цепях молекул фибриногена, причем на каждую половину молекулы фибриногена приходится по 2 ключевые последовательности Arg-Gly-Asp. Следует подчеркнуть, что ключевая последовательность Arg-Gly-Asp узнаваема большинством представителей семейства интегринов. Тонкие механизмы взаимодействия II_b/III_a -рецепторов с адгезивными молекулами до конца не изучены, но очевидно, что пептиды или мелкие молекулы, содержащие ключевую последовательность аминокислот Arg-Gly-Asp, могут

Вторая цепочка аминокислот, узнаваемая II_b/III_a -рецепторами тромбоцитов, — $\text{Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val}$. Она находится в карбоксильном конце γ -цепей фибриногена. В отличие от цепочки Arg-Gly-Asp цепочку $\text{Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val}$ обнаружили только в молекуле фибриногена и, вероятно, именно в этом месте фибриноген связывается с II_b/III_a -рецепторами тромбоцитов. Взаимосвязь между 2 цепочками до конца не ясна. Показано, что пептиды из γ -цепей фибриногена ингибируют связывание фибронектина и фФВ с тромбоцитами. Это может быть связано с тем, что места на II_b/III_a -рецепторах, узнающие как первую, так и вторую цепочку, частично перекрываются, или же с аллостерическим взаимодействием участков рецепторов, узнающих 2 упомянутые цепочки аминокислот. Предполагают, что обе цепочки аминокислот взаимодействуют с несколькими участками II_b/III_a -рецептора.

РОЛЬ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Обсуждая роль тромбоцитов в патогенезе артериального тромбоза, необходимо упомянуть о 2 прямо противоположных по своему действию на тромбоциты и гладкую мускулатуру веществах: тромбоксане A_2 и простаглицлине. Оба соединения — конечные продукты метаболизма арахидоновой кислоты.

Арахидоновая кислота — предшественник всех классов простаглицлинов (PG). Синтез арахидоновой кислоты в организме осуществляется из фосфолипидов под действием фосфолипазы. Основной источник арахидоновой кислоты — ненасыщенные жирные кислоты, поступающие в организм с пищей. Превращение арахидоновой кислоты в организме осуществляется под действием 2 ферментов: липооксигеназы и циклооксигеназы. Под действием циклооксигеназы из арахидоновой кислоты образуются циклические эндоперекиси PGG_2 и H_2 , которые в дальнейшем превращаются в тромбоксан A_2 и простаглицлин, PGD_2 , E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$. Тромбоксан A_2 , образующийся под действием фермента тромбоксансинтетазы, — нестабильное соединение ($t_{1/2}$ составляет около 30 с), он быстро превращается в стабильный продукт тромбоксан B_2 . Тромбоксан A_2 образуется в тромбоцитах и выделяется в кровоток в процессе реакции освобождения, однако было установлено, что небольшие количества тромбоксана A_2

образуются в эндотелии внутренней оболочки аорты, а также в фибробластах легочной ткани, микросомах радужной оболочки глаза, в перфузируемой почке, пупочной артерии, плаценте; в малых количествах он образуется практически во всех сосудах человека. Тромбоксан A_2 — мощный проагрегант и вазоконстриктор.

ПРОСТАЦИКЛИН

Простациклин образуется в эндотелиальных клетках сосудов под действием фермента простациклинсинтетазы. $T_{1/2}$ составляет 2–3 мин. Простациклин имеет несколько стабильных метаболитов, основной из которых — 6-кетоPGF $_{1\alpha}$. Полагают, что его содержание отражает содержание простациклина в плазме крови. Простациклин — мощный системный вазодилататор и антиагрегант. Последнее обусловлено активацией в мембране тромбоцитов аденилатциклазного механизма, приводящего к увеличению в тромбоцитах содержания цАМФ, уменьшению свободного цитоплазматического кальция и снижению агрегационной способности тромбоцитов. Простациклин — вещество, образующееся *in situ*. Импульсом к образованию простациклина эндотелиальными клетками могут быть повреждение целостности эндотелия, а также появление в кровотоке тромбина. При адгезии тромбоцитов к месту поврежденного сосуда из них выделяется тромбоксан, одновременно с этим из эндотелиальных клеток выделяется простациклин, ограничивая или предотвращая процесс тромбообразования.

Известно, что серозные оболочки, в том числе и перикард, образуют простациклиноподобные субстанции, причем простациклин, содержащийся в перикардимальной жидкости, способен влиять на коронарный кровоток. С возрастом при развитии атеросклероза синтез простациклина сосудистой стенкой снижается.

ТРОМБОКСАН

С появлением исследований Монкада и Вейна, посвященных метаболитам арахидоновой кислоты, в начале 70-х годов начался период активного изучения роли тромбоксана и простациклина в патогенезе коронарного спазма и тромбоза. В конце 70-х и 80-х годах была опубликована серия исследований, посвященных ро-

ли дисбаланса в соотношении тромбоксан/простаглицлин в патогенезе коронарного тромбоза и спазма. Результаты показали, что у больных стенокардией во время ишемии миокарда, вызванной стимуляцией предсердий, в крови, оттекающей непосредственно от миокарда, повышается содержание тромбоксана B_2 . Кроме того, было показано, что при отсутствии различий в покое у здоровых и больных стенокардией в содержании тромбоксана B_2 и 6-кетоPGF $_{1\alpha}$ по реакции на физическую нагрузку больные ИБС отличаются от здоровых преобладанием выброса тромбоксана и снижением выброса простаглицлина. Эти данные позволили группе исследователей во главе с Мехта выдвинуть гипотезу о роли дисбаланса в соотношении тромбоксан/простаглицлин в изменении сосудистого тонуса и происхождении ишемии миокарда. В дальнейшем появились данные о повышении содержания тромбоксана в крови, оттекающей непосредственно от миокарда (из коронарного синуса), у больных нестабильной стенокардией (Хирш и соавт., 1981) и во время индуцированной ишемии миокарда (Леви и соавт., 1980). Огромный интерес вызывали работы Мехта и соавт. (1984), Робертсона и соавт. (1981, 1983), продемонстрировавшие нарастание содержания тромбоксана B_2 в крови коронарного синуса во время спонтанных приступов у больных с вазоспастической формой стенокардии. По мнению авторов, увеличение содержания тромбоксана определяло коронарный тонус и способствовало возникновению и усугублению ишемии. Высказывалась гипотеза, что происхождение приступов вазоспастической стенокардии может быть связано с активацией тромбоцитов, выбросом тромбоксана и быстрым образованием тромбоцитарного тромба в месте спазма коронарной артерии. Однако последующие исследования, проведенные у больных со спонтанной ишемией миокарда и взятием крови из коронарного синуса за несколько минут до возникновения приступа стенокардии, показали, что увеличение концентрации тромбоксана в момент приступа вторично по отношению к спазму и ишемии миокарда, а кроме того, угнетение синтеза тромбоксана с помощью аспирина, индометацина не уменьшало частоту эпизодов ишемии у больных вазоспастической стенокардией.

Итак, на сегодняшний день существуют экспериментальные и морфологические доказательства роли тромбоцитов в патогене-

незе атеротромбоза. Кроме того, результаты изучения маркеров активированных тромбоцитов (β -тромбоглобулин, тромбоцитарный фактор IV, тромбоксан B_2) у больных с такими клиническими проявлениями атеросклероза, как инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, инсульт и перемежающаяся хромота, указывают на существенное повышение их содержания по сравнению со здоровыми людьми. Результаты исследований показывают, что подавляющее большинство признаков активации тромбоцитов при атеросклерозе вторично по отношению к патологии внутренней стенки сосудов. Вопрос о том, могут ли обнаруживаемые у отдельных больных гиперактивные тромбоциты *per se* участвовать в развитии атеросклероза и тромбоза, остается открытым. Имеются данные (Кристенсен, Мартин, 1992), что тромбоциты больших размеров обладают большей реактивностью, чем малые; осложнения инфаркта миокарда чаще отмечены у больных, имеющих тромбоциты больших размеров. Поскольку тромбоцит — безъядерная клетка, его размеры определяются размерами предшественника — мегакариоцита. Было показано, что тромбоциты больших размеров образуются из больших мегакариоцитов, а размеры последних контролируются цитокинами и ИЛ-6. Эти данные указывают на связь воспаления и тромбообразования.

И наконец, существенный вклад в доказательство роли тромбоцитов в патогенезе артериального тромбоза внесли многочисленные крупные проспективные исследования по изучению эффективности антитромбоцитарных препаратов у больных с различными клиническими проявлениями атеросклероза. Считается доказанным, что назначение аспирина (препарата, необратимо угнетающего циклооксигеназу тромбоцитов) в среднем на 25% снижает частоту развития инфаркта миокарда, инсульта и внезапной сердечно-сосудистой смерти. Антитромбоцитарный препарат клопидогрел, механизм действия которого связан с блокадой АДФ-индуцированной активации II_b/III_a -рецепторов тромбоцитов, повышает этот процент до 33. Анализ 3 исследований, посвященных применению абциксимаба (ингибитор II_b/III_a -рецепторов антительной природы) перед процедурой коронарной баллонной ангиопластики, убедительно продемонстрировал его эффективность в отношении тромбоцических осложнений, кото-

рые в наибольшей степени выражены у больных нестабильной стенокардией.

2.5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Нормально функционирующая система гемостаза должна обеспечивать сохранность жидкого состояния крови в пределах сосудов и быстрое тромбирование поврежденных участков для предотвращения кровопотери и кровоизлияния в ткани. Нарушения системы гемостаза могут быть как врожденными, так и приобретенными и проявляться кровотечениями или тромбозами. В основе заболеваний могут лежать нарушения механизмов регуляции гемостаза: аномалии стенки сосудов, клеток крови (чаще всего тромбоцитов) и факторов плазмы. Применяемые в настоящее время методы лабораторного исследования системы гемостаза могут быть разделены на скрининговые (глобальные) и специальные.

2.5.1. ЗАБОР КРОВИ ДЛЯ КОАГУЛОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ

Результат коагулологических исследований во многом зависит от того, как собиралась и обрабатывалась кровь. Активация свертывания во время получения или обработки крови может привести к непредсказуемому результату большинства тестов. Для предотвращения активации свертывания компрессия вены не должна превышать 1 мин, и первые капли крови, которые могут содержать тканевый фактор, лучше для этих анализов не использовать. Кровь необходимо собирать в вакутейнер или пластиковую пробирку, содержащие антикоагулянт.

Наиболее часто в качестве антикоагулянта используют 1/10 объема 0,11 М раствора цитрата натрия (3,2% раствор трехзамещенной двуводной соли — $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Кровь необходимо немедленно и аккуратно перемешать с антикоагулянтом. Ионы Ca^{2+} необходимы для активации, но образовавшийся тромбин может проявлять прокоагулянтное действие и в отсутствие Ca^{2+} . Поэтому задержка с перемешиванием крови увеличивает вероятность ошибочного результата при тестировании. Перед центрифугированием необходимо внимательно проверить пробирку на

наличие сгустков. Лучший способ проверки — фильтрование через нейлоновую сетку. При обнаружении нитей фибрина образец необходимо выбраковывать.

Для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугируют в течение 10 мин при 2000–3000 g (~ 3000 об/мин). Температурный режим зависит от того, какие анализы предполагается выполнять. Для анализов на волчаночные антикоагулянты и маркеры активации тромбоцитов требуется дополнительная обработка плазмы, обеспечивающая более полное удаление клеток.

При значительном отклонении гематокрита от нормы может потребоваться изменение соотношения крови и антикоагулянта. При гематокрите $< 0,25$ 1/10 объема цитрата может оказаться недостаточно для снижения концентрации Ca^{2+} ниже пороговой величины, а при высоком гематокрите увеличится разведение плазмы цитратом, что приведет к кажущемуся снижению содержания факторов. Определить количество цитрата, которое необходимо внести в пробирку для получения 10 мл конечного объема крови, можно по формуле:

$$\text{Объем цитрата (мл)} = \frac{100 - \text{Ht}}{55},$$

где Ht — гематокрит.

Цитрат не ингибирует активацию тромбоцитов и секрецию компонентов их α -гранул. Поэтому для точного определения содержания в плазме маркеров активации тромбоцитов (фактора IV и β -тромбоглобулина), Ag ИАП-1 или гепарина необходимо использовать специальный антикоагулянт, препятствующий активации тромбоцитов *in vitro*. Этот антикоагулянт получил название СТАД по первым буквам компонентов, входящих в его состав: 0,11 М — цитрат (С), 15 мМ — теофиллин (Т), 3,3 мМ — аденозин (А) и 0,2 мМ — дипиридамола (D), рН 5,0. Кровь, собранная с этим антикоагулянтом, может быть использована для большинства коагулологических анализов, за исключением, разумеется, исследования активации тромбоцитов.

2.5.2. СКРИНИНГОВЫЕ ТЕСТЫ

К скрининговым методам относят методы, в которых исследуют активацию ряда реакций, отражающих определенную

последовательность превращений компонентов системы. Диагностическая значимость глобальных тестов определяется тем, что нормальные результаты позволяют исключить наличие значительных отклонений в содержании компонентов системы, в то время как аномальные результаты в большинстве случаев позволяют конкретизировать направление поиска дефектного звена. Кроме того, глобальные тесты используют также и для контроля антикоагулянтной терапии. В настоящее время для начального исследования наиболее широко используют следующие тесты:

- 1) протромбиновый тест (ПТ);
- 2) активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ);
- 3) тромбиновое время/рептилазное время (ТВ/РВ);
- 4) фибриноген;
- 5) лизис эуглобулинов;
- 6) время кровотечения.

К глобальным тестам могут быть отнесены также время свертывания, время рекальцификации, каолиновое и кефалиновое время, тромбоэластография и ряд других. Однако эти тесты, по сути, отражают те же реакции, что и перечисленные выше основные, и их использование в большинстве случаев не позволяет значительно расширить информативность основных методов.

Нормальные результаты первых 2 глобальных тестов (ПТ и АЧТВ), отражающих активацию по внешнему и внутреннему пути свертывания крови, позволяют исключить наличие значительных дефектов большинства плазменных компонентов этой системы. Исключение составляет фактор XIII, дефицит которого в этих тестах не проявляется, но может быть причиной геморрагического синдрома у новорожденных, кровоточивости и медленного заживления ран. Направление дальнейших исследований зависит от клинических показаний.

При подозрении на гипокоагуляцию (кровоточивость) скрининговые тесты должны быть дополнены исследованием:

- 1) фФВ (активность — кофактор ристоцетина, Ag);
- 2) фактора XIII;
- 3) количества и агрегации тромбоцитов;
- 4) отдельных факторов и ингибиторов к ним;
- 5) ингибиторов фибринолиза.

При наличии признаков гиперкоагуляции (повышенный уровень маркеров активации) и тромбообразования целесообразно проведение исследования:

- 1) компонентов системы свертывания (фибриноген, фактор VII и его активированная форма, фактор VIII, резистентность фактора V к ПрСа);
- 2) наличия волчаночного антикоагулянта;
- 3) компонентов системы противосвертывания (антитромбин III, ПрС, ПрS, ГК-II);
- 4) активаторов фибринолиза, включая факторы XII и прекалликреин;
- 5) ингибиторов активаторов фибринолиза.

Диагностика причин тромбообразования — значительно более сложная задача, чем диагностика дефицита факторов системы свертывания. Врожденный дефицит компонентов системы противосвертывания обнаруживают довольно редко. Приобретенный дефицит отмечают значительно чаще, но в большинстве случаев его причина заключается в нарушении функций печени или регуляции системы гемостаза. Изменение функционального состояния эндотелия — по-видимому, ведущая причина патологического тромбообразования при многих заболеваниях (атеросклероз, сахарный диабет, гемоцистеинурия, новообразования, сепсис и т. д.). Однако до настоящего времени не предложено приемлемого для клиники метода исследования антикоагулянтных свойств эндотелия. Возможность диагностики ограничивается измерением циркулирующих в крови компонентов и маркеров их активации.

2.5.3. ПРОТРОМБИНОВЫЙ ТЕСТ

ПТ — один из наиболее часто выполняемых коагулологических анализов. Он был предложен А. Квиком и соавт. в 1935 г., и его часто называют по имени первого из авторов методики тестом Квика. Принцип метода состоит в определении времени свертывания цитратной плазмы (в некоторых вариантах цельной крови) после добавления тромбопластина и Ca^{2+} . Хотя в названии теста, которое было дано задолго до выяснения основных реакций свертывания, присутствует наименование только

одного из факторов, в действительности результат теста зависит от:

- 1) содержания факторов VII, X, V, протромбина и фибриногена;
- 2) наличия патологических ингибиторов:
 - полимеризации фибрина (продукты деградации фибрина, миеломные белки);
 - фосфолипидзависимых реакций.

Техника выполнения ПТ очень проста. Достаточно иметь термостат на 37 °С, секундомер, пробирки и пипетки. Однако при очевидной простоте выполнения самого теста оценка его результатов представляет серьезную проблему, окончательно не решенную до настоящего времени. Две основные причины обуславливают сложность проблемы:

- Во-первых, в тесте реализуется ряд последовательных и взаимовлияющих реакций и суммарная скорость зависит от множества параметров.

- Во-вторых, тромбопластин — частично очищенный экстракт, получаемый из тканей мозга, легких или плаценты разных млекопитающих, включая человека. Время свертывания нормальной и, что исключительно важно, патологической плазмы значительно варьирует в зависимости от источника и метода получения тромбопластина.

Для выражения результатов ПТ используют:

- 1) время свертывания в секундах;
- 2) протромбиновое отношение (ПО), которое определяют как время свертывания плазмы больного, деленное на время свертывания нормальной плазмы:

$$\frac{\text{время свертывания плазмы больного}}{\text{время свертывания нормальной плазмы}};$$

- 3) процент протромбинового индекса, который определяют как время свертывания нормальной плазмы, деленное на время свертывания плазмы больного и умноженное на 100. Величине присваивают размерность %;

$$\frac{\text{время свертывания нормальной плазмы}}{\text{время свертывания плазмы больного}} \times 100;$$

- 4) процент от нормы;
- 5) международное нормализованное отношение (МНО).

Первые 3 системы выражения результатов ПТ имеют серьезные недостатки, и от них следует отказаться. Время свертывания, ПО и процент протромбинового индекса свидетельствуют только о том, отличается ли плазма больного от нормальной, а информация о том, насколько они различаются в действительности, скрыта от исследователя.

По методу Квика для перевода времени свертывания в процент протромбина строится калибровочный график. В основе его построения лежит простой логический принцип. Если содержание факторов протромбинового комплекса в нормальной плазме принять за 100%, то в разведенной в 2 раза оно будет 50%, в 4 раза — 25% и т. д. На рис. 2.10, А показаны примеры влияния снижения концентрации факторов на время свертывания при определении с использованием 4 разных тромбопластинов. Как видно из рисунка, тромбопластин может обладать высокой активностью* (~11 с) при плохой чувствительности к снижению концентрации факторов и низкой активностью (~23 с) при высокой чувствительности к дефициту факторов. Поэтому ни время свертывания, ни ПО и процент протромбинового индекса, представляющие собой время свертывания, умноженное или деленное на константу, не позволяют судить о том, насколько велика разница в содержании факторов. Другими словами, это некалиброванные величины, которые поэтому не должны использоваться. Проблема усложняется тем, что значения этих параметров варьируют не только между лабораториями, но и в пределах одной лаборатории при переходе от одной партии тромбопластина к другой, даже если они выпущены одним и тем же производителем.

В ПТ графики зависимости времени свертывания от концентрации факторов протромбинового комплекса имеют форму обратной функции ($y = 1/x$). Использование нелинейных графиков для перевода секунд (с) в процент протромбина не очень удобно. Поэтому для вычислений применяют линеализацию графика в координатах 1/% протромбина (т. е. 100% — 0,01; 50% —

* В отечественной литературе под активностью тромбопластина подразумевают время свертывания данным препаратом нормальной плазмы.

0,02; 25% — 0,04; 12,5% — 0,08) от времени свертывания, как показано на рис. 2.10, Б. Во многих современных коагулометрах используют именно этот подход и метод линейной регрессии для расчета калибровочного графика и обратного перевода секунд в процент протромбина по Квику. При такой оценке результатов нормальными принято считать значения протромбина $\geq 70\%$.

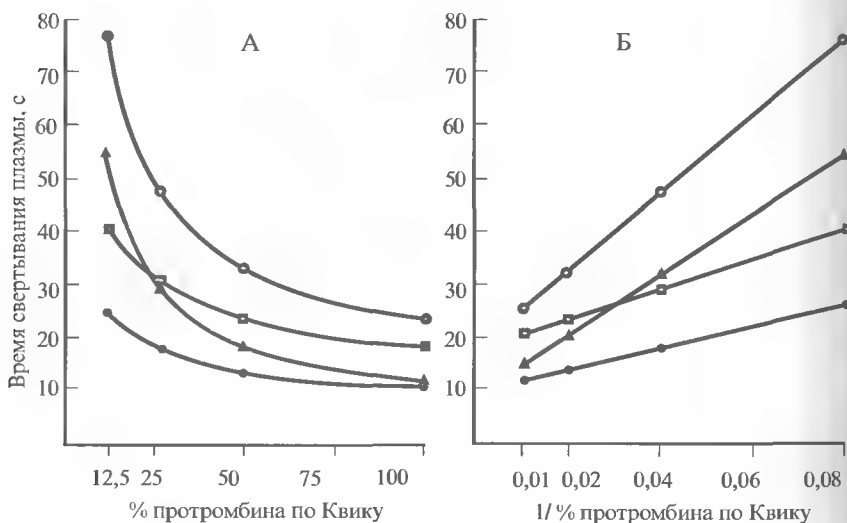


Рис. 2.10. Влияние разведения плазмы на время свертывания, измеряемое при использовании разных тромбопластинов (А). Построение калибровочного графика по Квику в координатах 1/% протромбина — секунды свертывания (Б)

К недостаткам этого метода калибровки ПТ относят то, что разведение плазмы моделирует только снижение концентрации факторов, которое может наблюдаться, например, при нарушении синтеза белков в печени. Однако при другой патологии (дефицит витамина К или прием его антагонистов — пероральных антикоагулянтов) концентрация факторов может быть близкой к норме, но их функциональные свойства, определяющие взаимодействие и активацию факторов, существенно нарушены.

Международное нормализованное отношение (МНО). Другой метод стандартизации ПТ был принят ВОЗ в 1981 г. и модифицирован в 1983 г. В его основе лежит наличие линейной

зависимости между логарифмами протромбинового времени, определенными с разными тромбопластинами, для плазмы больных, находящихся в стабильной фазе терапии пероральными антикоагулянтами. На практике это означает, что значения ПО, определенные с использованием разных тромбопластинов, могут быть приведены математически к одной величине, которая была бы получена при определении протромбина с неким стандартным тромбопластином. Эту величину предложили называть МНО — международным нормализованным отношением (от англ. INR — international normalized ratio).

Математическая операция, позволяющая перевести результаты ПТ в один масштаб, — возведение ПО в степень, характеризующую чувствительность используемого препарата тромбопластина. Чувствительность первичного стандарта тромбопластина, зарегистрированного ВОЗ, была принята за 1,0, а всех последующих, включая национальные, должна вычисляться по отношению к этому стандарту тромбопластина.

Для вычисления чувствительности тромбопластина определяют значения протромбинового времени для серии нормальных и патологических плазм с использованием 2 тромбопластинов — стандартного (референтного) и анализируемого. Затем строится график, в котором по оси ординат откладывают значение логарифмов протромбинового времени, измеренного с референтным тромбопластином, а по оси абсцисс — с анализируемым. Тангенс угла наклона этого графика — МИЧ (от англ. ISI — international sensitivity index — международный индекс чувствительности) анализируемого тромбопластина. Линейный характер зависимости между логарифмами протромбинового времени и ПО означает, что значение ПО, которое получили бы при определении данного образца плазмы с использованием референтного тромбопластина (МНО), может быть вычислено путем возведения ПО, определенного с любым тромбопластином, в степень, равную МИЧ этого тромбопластина:

$$\text{МНО} = (\text{ПО})^{\text{МИЧ}}.$$

Определение МИЧ — трудоемкая процедура. Первоначально для определения МИЧ предлагалось измерение протромбинового времени с 2 тромбопластинами в 80 образцах, из которых 60

в использовании набора калибровочных плазм для локальной стандартизации.

Набор состоит из 4 лиофилизированных плазм: 1 нормальной и 3, полученных от доноров, находящихся в стабильной фазе терапии пероральными антикоагулянтами низкой, средней и высокой интенсивности. С использованием этих плазм в лаборатории клиники строят калибровочный график в двойных логарифмических координатах для перевода секунд свертывания в МНО. Этот график уже учитывает характеристики как коагулометра, так и тромбопластина, используемых в лаборатории. По номограмме, предлагаемой производителем калибровочных плазм, может быть вычислен и МИЧ используемого тромбопластина. К важным преимуществам данного метода калибровки относят также и то, что он менее трудоемкий, чем принятый ВОЗ в 1983 г. Кроме того, построение калибровочного графика по 4 образцам плазмы уменьшает величину ошибки, обусловленной отклонением определенного в лаборатории значения времени свертывания нормальной плазмы от истинного. Вклад этой ошибки в конечный результат (вычисленное значение МНО) будет тем больше, чем ниже чувствительность (выше МИЧ) тромбопластина. Однако этот метод предложен относительно недавно, и только после проведения больших клинических исследований можно будет решить, какой из методов обеспечивает лучший контроль терапии.

МИЧ для различных тромбопластинов, получаемых из экстрактов тканей, варьирует от 0,9 до 2,8. Чем выше значение МИЧ, тем менее чувствителен тромбопластин к изменению содержания компонентов протромбинового комплекса и, следовательно, тем больше может быть ошибка результата ПТ. Тромбопластины с МИЧ более чем 2,0 лучше вообще не использовать, так как для достижения необходимой степени точности придется выполнять много параллельных определений одной пробы.

Основная цель, которую преследовало введение МНО, состояла в обеспечении оптимизации терапии пероральными антикоагулянтами. Использование единой системы контроля позволяет обобщать опыт, накопленный в разных клиниках, для подбора оптимального соотношения между риском развития тромбоза

и кровотечения. В специальном докладе Американской кардиологической ассоциации, опубликованном в 1994 г., предложено при подборе дозы антикоагулянтов ориентироваться на терапевтические пределы МНО от 2,0 до 3,5.

Таким образом, целесообразно использовать 2 варианта представления результатов ПТ, что позволит объединить преимущества каждого из них. Калибровка по Квику моделирует дефицит факторов и переводит результат теста в линейную шкалу, по которой легче ориентироваться в динамике факторов свертывания, а использование системы МНО обеспечит более надежный контроль интенсивности антикоагулянтной терапии.

В завершение анализа ПТ остановимся на одной методической проблеме. Этот тест может выполняться с использованием как плазмы, полученной из венозной крови, так и капиллярной крови. Определение в капиллярной крови представляется предпочтительным, так как не требует пункции вены. Однако при кажущейся простоте в действительности оно сопряжено с рядом проблем.

Первая и главная проблема заключается в большей вероятности активации свертывания при заборе капиллярной крови. Кровь, проходя через поврежденную ткань, неизбежно контактирует с тромбогенной поверхностью и может активироваться. Это приводит вначале к кажущемуся увеличению содержания факторов (гиперкоагуляции), которое в действительности может быть лишь следствием их активации, а затем переходит в снижение содержания факторов (гипокоагуляцию), обусловленное низкой стабильностью активированных форм. Поэтому капиллярная кровь должна анализироваться как можно быстрее после забора.

Вторая проблема связана с объемом крови, необходимой для анализа. В стандартном варианте постановки ПТ используют 100 мкл плазмы и 200 мкл Са-тромбопластина. Быстро и аккуратно (без выдавливания из места прокола) отобрать даже 100 мкл крови удастся не всегда. Поэтому для ПТ из капиллярной крови применяют реактив, содержащий, кроме тромбопластина, еще и плазму, из которой удалены факторы VII, X и протромбин. Это обеспечивает возможность выполнения теста с использованием всего 20–50 мкл капиллярной крови,

и кровотечения. В специальном докладе Американской кардиологической ассоциации, опубликованном в 1994 г., предложено при подборе дозы антикоагулянтов ориентироваться на терапевтические пределы МНО от 2,0 до 3,5.

Таким образом, целесообразно использовать 2 варианта представления результатов ПТ, что позволит объединить преимущества каждого из них. Калибровка по Квику моделирует дефицит факторов и переводит результат теста в линейную шкалу, по которой легче ориентироваться в динамике факторов свертывания, а использование системы МНО обеспечит более надежный контроль интенсивности антикоагулянтной терапии.

В завершение анализа ПТ остановимся на одной методической проблеме. Этот тест может выполняться с использованием как плазмы, полученной из венозной крови, так и капиллярной крови. Определение в капиллярной крови представляется предпочтительным, так как не требует пункции вены. Однако при кажущейся простоте в действительности оно сопряжено с рядом проблем.

Первая и главная проблема заключается в большей вероятности активации свертывания при заборе капиллярной крови. Кровь, проходя через поврежденную ткань, неизбежно контактирует с тромбогенной поверхностью и может активироваться. Это приводит вначале к кажущемуся увеличению содержания факторов (гиперкоагуляции), которое в действительности может быть лишь следствием их активации, а затем переходит в снижение содержания факторов (гипокоагуляцию), обусловленное низкой стабильностью активированных форм. Поэтому капиллярная кровь должна анализироваться как можно быстрее после забора.

Вторая проблема связана с объемом крови, необходимой для анализа. В стандартном варианте постановки ПТ используют 100 мкл плазмы и 200 мкл Са-тромбопластина. Быстро и аккуратно (без выдавливания из места прокола) отобрать даже 100 мкл крови удастся не всегда. Поэтому для ПТ из капиллярной крови применяют реактив, содержащий, кроме тромбопластина, еще и плазму, из которой удалены факторы VII,

которая либо непосредственно вносится в реактив (при определении в присутствии больного), либо смешивается с буфером, содержащим цитрат, и доставляется в лабораторию для серийных исследований. Этот реактив может использоваться также и для определения протромбина в цитратной плазме. Преимущество постановки ПТ с использованием малого объема плазмы больного и адсорбированной плазмы как источника фибриногена и фактора V заключается в меньшей чувствительности этого метода к аномалиям фибриногена и ингибиторам полимеризации.

Наконец, третья проблема связана с влиянием гематокрита на результат теста. При внесении пипеткой в кювету стандартного объема цельной крови объем внесенной плазмы и, следовательно, концентрация факторов в реакционной смеси будут зависеть от величины гематокрита. При выражении результатов ПТ в виде процента по Квику влияние гематокрита может быть легко учтено путем умножения определенного по калибровке значения процента от нормы на коррективный фактор

$$\frac{0,55}{1 - \text{Ht(больного)}},$$

представляющий собой соотношение удельных объемов плазмы в норме и у анализируемого больного. Влияние гематокрита на ПО и его производные (процент протромбинового индекса и МНО) значительно сложнее и не может быть скорректировано с помощью простого фактора.

2.5.4. АКТИВИРОВАННОЕ ЧАСТИЧНОЕ ТРОМБОПЛАСТИНОВОЕ ВРЕМЯ

В основе этого теста лежит определение времени свертывания плазмы в присутствии активатора контактной фазы и фосфолипидов (частичного тромбопластина) после добавления CaCl_2 . В качестве активатора контактной фазы ранее широко использовалась суспензия каолина. В последнее время предпочтение отдают эллаговой кислоте или микрочастицам окиси кремния. Эти реактивы не требуют постоянного перемешивания; они оптически прозрачные, что позволяет использовать любые типы

коагулометров. В качестве фосфолипидов, заменяющих собой фактор III тромбоцитов, чаще всего используют спиртовой экстракт ткани мозга, состоящий в основном из кефалина.

АЧТВ — тест на внутренний путь свертывания и зависит от всех факторов, за исключением VII и XIII. Его удлинение наблюдают при:

- 1) дефиците/аномалии факторов;
- 2) терапии гепарином и в меньшей степени антагонистами витамина K;
- 3) наличии патологических ингибиторов:
 - полимеризации фибрина (продукты деградации фибрина, миеломные белки);
 - инактивирующих факторов.

Следует отметить, что в тесте на АЧТВ реализуется целый набор реакций, включающих прямые (последовательные), шунтирующие и взаимоускоряющиеся, которые в конечном счете приводят к резкому нарастанию образования тромбина и полимеризации фибрина. Поэтому заметное превышение величины АЧТВ по сравнению с верхней границей нормального распределения наблюдают лишь при выраженном снижении уровня факторов (как правило, менее 30% от нормы).

Скорость процесса в таких сложных системах определяется в основном скоростью самой медленной реакции. В тесте определения АЧТВ такова реципрокная активация тромбином фактора VIII, протекающая в растворе и эффективно ингибируемая комплексом антитромбин III–гепарин. Это делает АЧТВ удобным показателем лабораторного контроля интенсивности гепаринотерапии. Недостаток определения АЧТВ (как метода контроля гепаринотерапии) — зависимость этого теста от многих факторов, что при некоторых патологических состояниях может приводить к несоответствию между истинной концентрацией гепарина в крови и ожидаемой, исходя из данных АЧТВ. Например, в послеоперационном периоде и при активации воспалительных реакций повышение уровня фактора VIII и фибриногена, фибронектина, факторов системы комплемента и др. может уменьшать влияние гепарина на АЧТВ, а дефицит факторов и наличие аномальных антикоагулянтов — усиливать его эффект. Очевидно,

что влияние гепарина на эту систему зависит также и от уровня антитромбина III.

Удлинение АЧТВ при нормальном значении протромбинового времени может быть обусловлено дефицитом факторов XII, XI, IX, VIII, а также прекалликреина и ВМК или наличием ингибиторов к этим факторам. Простейший способ дифференцировки дефицита от присутствия ингибиторов — исследование коррекции АЧТВ после добавления к исследуемой плазме небольшого количества нормальной. В случае дефицита факторов добавление уже 10–25% объема нормальной плазмы к исследуемой приводит к значительному сокращению (нормализации) АЧТВ, что не наблюдается при наличии ингибитора(ов) к факторам. Правда, если ингибитор медленно действующий (так называемый прогрессивный), то для его выявления смесь плазм необходимо выдержать в течение 1–2 ч до начала измерения. Длительная инкубация исследуемой плазмы с нормальной повышает вероятность выявления патологических ингибиторов свертывания. Наиболее часто ингибиторы к факторам свертывания выявляют у больных гемофилией А (антифактор VIII:C), находящихся на заместительной терапии, и при аутоиммунных заболеваниях. В последнем случае это иммуноглобулины, влияющие на взаимодействие факторов систем свертывания и противосвертывания с фосфолипидами.

На основе АЧТВ разработаны методы количественного определения факторов XII, XI, IX и VIII. В так называемых одностадийных тестах определение этих факторов проводят по калибровочным графикам, которые строятся с использованием смеси дефицитной по исследуемому фактору плазмы и разведений в геометрической прогрессии стандартной (с известным содержанием фактора) плазмы. Из-за каскадной природы реакций теста зависимость времени свертывания от содержания фактора имеет экспоненциальный характер и для линеализации графиков используют логарифмирование. Обычно линеализацию удается получить при содержании/активности фактора в смеси от 1 до 10% от нормы. Для наиболее точного определения уровня фактора у больного желательно подобрать такое разведение исследуемой плазмы, которое обеспечивает время свертывания вблизи средней области калибровочного графика. В области

высокой концентрации фактора снижение точности определения обусловлено увеличением относительного вклада других реакций в суммарную скорость теста, а в области низкой концентрации фактора — увеличением вклада остаточной активности фактора в дефицитной плазме. Остаточная активность обусловлена не только примесью фактора, которая может быть очень низкой в плазме, очищенной на колонках с АТ, но и наличием шунтирующих (обходных) путей активации.

Серьезная и пока нерешенная проблема использования АЧТВ в диагностике — стандартизация теста. Очевидно, что стандартизировать тест, который определяет набор реакций и зависит от многих факторов, крайне сложно или, что вполне вероятно, невозможно. Реактивы, выпускаемые разными производителями, отличаются не только по разбросу значений, определяемых в норме, но и по чувствительности к ингибиторам и дефициту факторов. Лаборатории целесообразно подобрать в соответствии со специализацией наиболее подходящий реактив, используемый в качестве основного, и иметь некоторое количество специализированного реактива, обладающего, например, повышенной чувствительностью к волчаночному антикоагулянту.

2.5.5. ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ

Этот тест относят к числу скрининговых, и его необходимо выполнять, если результаты ПТ или АЧТВ превышают нормальные значения. В этом случае определение времени свертывания плазмы после добавления стандартного количества тромбина может сузить диапазон поиска дефектного звена. Удлинение ТВ наблюдают при:

- 1) аномалии фибриногена — выраженная ($< 0,3$ г/л) гипофибриногенемия, дисфибриногенемия;
- 2) антикоагулянтной терапии гепарином или прямыми ингибиторами тромбина (гирудин, гирулог, синтетические ингибиторы), но не антагонистами витамина К;
- 3) наличии патологических ингибиторов полимеризации фибрина:
 - продуктов деградации фибриногена/фибрина;
 - аномальных антикоагулянтов (миеломных белков).

Нормальные значения ТВ зависят от активности тромбина. Для наиболее часто используемых растворов, содержащих 3 или 6 МЕ тромбина/мл, нормальные значения находятся соответственно в пределах 10–13 и 17–22 с. Чем ниже концентрация тромбина, тем выше чувствительность теста к аномалиям. В связи с этим выбор варианта постановки теста на определение ТВ определяется задачей исследования. Для диагностики продуктов расщепления фибриногена, гипофибриногенемии или дисфибриногенемии целесообразнее использовать реактив меньшей активности. В то же время этот тест обладает очень высокой чувствительностью к гепарину и при использовании реактива с активностью 17–22 с ТВ выходит за пределы определения даже при терапии низкими дозами гепарина. В связи с этим для контроля гепаринотерапии более подходят реактивы высокой активности. На чувствительность теста к гепарину влияют также рН и состав буфера, используемого для стабилизации тромбина.

В контроле гепаринотерапии АЧТВ и ТВ в большей степени взаимодополняют друг друга, чем служат альтернативными тестами. К преимуществам ТВ относят то, что на результат этого теста влияет меньшее число факторов, чем на АЧТВ. Он более специфично, чем АЧТВ, отражает активность комплекса антитромбин III–гепарин в плазме. В то же время с помощью АЧТВ контролируют влияние гепарина на активацию свертывания, что представляется более важным и могло бы быть аргументом в пользу бесспорного преимущества этого теста перед ТВ. Однако активация свертывания и антикоагулянтный эффект гепарина в условиях проведения АЧТВ, так же как и антикоагулянтный эффект гепарина в ТВ, существенно отличаются от таковых при тромбообразовании *in vivo*. Другими словами, корреляция между антикоагулянтными эффектами гепарина *in vitro* и антитромботической активностью *in vivo* пока оставляет желать лучшего. Диагностическая значимость этих тестов в контроле гепаринотерапии ограничивается информацией о приблизительном уровне циркулирующих в крови комплексов гепарина с антитромбином III, что может служить основанием для изменения в соответствии с клиническими показаниями режима гепаринотерапии. Снижение чувствительности к гепарину

в ходе терапии может свидетельствовать о продолжающейся активации свертывания (тромбоцитов) и потреблении антитромбина III.

Более точное определение гепарина возможно по ингибированию тромбина или фактора X_a (последний тест используют также и для определения гепарина низкой молекулярной массы) при измерении их остаточной активности с помощью хромогенных субстратов. Однако стоимость этих тестов выше, чем ТВ или АЧТВ, а данных о более высокой диагностической значимости точного определения гепарина в клинических исследованиях не получено. Бесспорное преимущество этих тестов — возможность определения очень высоких концентраций гепарина, используемых при искусственном кровообращении. Альтернативный экспресс-метод мониторингирования гепаринотерапии высокой интенсивности — определение активированного времени свертывания (АВС). В этом тесте определяют время свертывания цельной крови после внесения в пробирку, содержащую стандартное количество активатора — измельченной диатомовой земли. Этот активатор вызывает лизис клеток крови и выброс фактора 4 тромбоцитов, что значительно снижает антикоагулянтный эффект гепарина и обеспечивает свертывание даже в присутствии исходно высокой концентрации гепарина. На основании АВС разработаны номограммы для расчета количества протаминсульфата, необходимого для нейтрализации циркулирующего гепарина после завершения операции.

2.5.6. РЕПТИЛАЗНОЕ ВРЕМЯ

Рептилаза (батроксобин) — тромбиноподобный фермент, выделяемый из яда змеи *Bothrops atrox*. В отличие от тромбина этот фермент не активирует тромбоциты, не инактивируется плазменными ингибиторами тромбина и гирудином. Поэтому он нечувствителен к гепарину. От фибриногена рептилаза отщепляет только фибринопептид А. Удлинение РВ наблюдают при:

- 1) аномалии фибриногена — выраженная ($< 0,3$ г/л) гипофибриногенемия, дисфибриногенемия;

2) наличии патологических ингибиторов полимеризации фибрина:

- продуктов разрушения фибриногена/фибрина;
- аномальных антикоагулянтов (миеломных белков).

Известны редкие случаи, например фибриноген «Мадебург I» и специфически инактивирующие тромбин иммуноглобулины, при которых может быть удлинено ТВ, но не РВ. Отсутствие зависимости от гепарина позволяет мониторировать с помощью РВ динамику фибриногена и продуктов его разрушения при тромболизисе и лечении ДВС антикоагулянтами. Рептилаза может использоваться также для получения сыворотки из гепаринизированной крови для количественного определения продуктов разрушения фибриногена/фибрина.

2.5.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА

В число скрининговых тестов должно входить определение фибриногена. Важность этого теста определяется двумя причинами. Во-первых, повышение концентрации фибриногена — фактор риска заболеваний ССС, по значимости сравнимый с гиперхолестеринемией. Во-вторых, фибриноген — белок острой фазы, поэтому в ряде случаев может оказаться необходимым наблюдение за его динамикой. Предложено несколько неравноценных подходов к определению фибриногена, и вполне реальной может оказаться ситуация, когда для диагностики потребуется применение двух различных методов. Применяемые методы могут быть разделены на 3 группы: функциональные (наиболее универсальные и должны занимать ведущее место в диагностике); паракоагуляционные; иммунологические. Каждый из подходов имеет свои преимущества и недостатки.

Метод Клаусса. Из функциональных тестов наиболее часто используют метод Клаусса. Метод основан на том, что при добавлении избытка тромбина к разбавленной плазме (обычно в разведении 1 : 10) скорость образования сгустка пропорциональна концентрации фибриногена. Как правило, в реактив добавляют инактиватор гепарина. Метод Клаусса можно использовать для определения фибриногена и у больных, находящихся на стан-

дартной гепаринотерапии*, но при очень высоком уровне гепаринизации, применяемой при экстракорпоральном кровообращении, концентрации инактиватора может оказаться недостаточно. К достоинствам метода относят то, что он позволяет быстро получить результат, и поэтому с равным успехом его можно использовать как для серийных, так и для одиночных экспресс-анализов.

Основной недостаток метода Клаусса — высокая чувствительность к ингибиторам полимеризации фибриногена (продуктам разрушения фибрина и др.), способным занижать результат. К другим недостаткам метода относят сравнительно узкий рабочий диапазон, зависящий от типа коагулометра (для большинства приборов максимальная концентрация отличается от минимальной лишь в 3 раза). Поскольку вариабельность уровня фибриногена у больных значительно больше, чем рабочий диапазон метода Клаусса, то часто приходится повторять определение с использованием другого разведения плазмы.

Метод, основанный на фотометрическом определении скорости преципитации дезАА-фибрина. Относительно недавно был предложен новый метод определения фибриногена, основанный на фотометрическом (турбодиметрическом) определении скорости преципитации дезАА-фибрина, образующегося под действием рептилазы. Основные достоинства этого метода — отсутствие чувствительности к применяемым в клинике ингибиторам тромбина, меньшая, чем у метода Клаусса, чувствительность к ингибиторам полимеризации, более широкий рабочий диапазон (от 0,8 до 8 г/л) и возможность применения на любом фотометре, включая автоматические биохимические анализаторы. Важное достоинство этого метода (реализуемое лишь при определении на регистрирующем фотометре) — возможность получения в тесте данных не только о концентрации фибриногена, но и об активации фибриногенолиза. Накопление в плазме ранних продуктов разрушения фибриногена (в основном

* Опыт применения метода Клаусса для определения фибриногена у больных, получающих прямые ингибиторы тромбина (гирудин, аргатробан и др.) мы не располагаем. Вполне вероятно, что благодаря высокой концентрации тромбина в реактиве эти препараты в терапевтических концентрациях не окажут заметного влияния на результат теста.

Х-фрагментов) приводит к увеличению продолжительности лаг-фазы реакции.

Методы на основе определения свертываемого белка. Некоторые тесты на фибриноген могут быть объединены в группу методов, позволяющих определить содержание свертываемого белка. Фибриноген в стандартном объеме плазмы свертывается (чаще всего тромбином, но могут использоваться рептилаза, Сатромбопластин и другие активаторы), а количество свернувшегося белка определяют фотометрически или взвешиванием после высушивания. Ранее для фотометрического определения сгусток отмывали в 0,9% растворе NaCl от других белков плазмы, затем растворяли в NaOH и измеряли A_{280} или белок по биуретовой реакции. Эти методы трудоемкие, требуют большого количества плазмы и из-за большого количества ручных операций увеличивают вероятность инфицирования персонала.

Усовершенствованный вариант этого подхода к определению фибриногена — измерение оптической плотности или светорассеяния до и после свертывания плазмы; разница нарастает при увеличении концентрации фибриногена в плазме. В некоторых современных анализаторах этот принцип измерения лежит в основе одновременного определения фибриногена с ПТ, АЧТВ или ТВ.

Недостаток этих методов — отсутствие учета скорости полимеризации, поэтому аномалии фибриногена, заключающиеся в снижении скорости полимеризации, могут быть не обнаружены. Очевидно также, что при значительном (по сравнению с нормой) увеличении времени свертывания в скрининговом тесте выданный результат определения фибриногена подчас занижен, так как нарастание светорассеяния может не достичь плато за заданное анализатору время определения.

Преципитационные методы, основанные на осаждении фибриногена с последующим определением объема осадка или величины светорассеяния, наименее специфичны, их используют в крайнем случае.

Иммунологические методы. Большое разнообразие возможностей определения фибриногена (и что очень важно, его производных) представляют иммунологические методы. Эти методы можно использовать для качественного, полуколичественного

(при анализе разведений образца) и количественного определения. Трудоемкость и время, необходимые для выполнения анализа, определяются применяемой методикой. Для экспресс-анализов могут применяться качественные методы и методы, основанные на нефелометрическом определении комплексов Ag-AT. Прост метод иммунодиффузии, однако он требует значительного времени для проведения. Наиболее высокую чувствительность обеспечивает ИФА. Применение комбинации 2 AT, выработанных к разным антигенным детерминантам, и использование в анализе системы усиления сигнала открывают практически неограниченные возможности для этого метода. Однако из-за длительности анализа и необходимости построения калибровочного графика (обычно нелинейного и поэтому требующего набора стандартов) в каждой серии определений этот метод малопригоден для одиночных анализов. Правда, методики быстро совершенствуются и уже появляются варианты ИФА, применимые и для одиночных определений.

2.5.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЛЧАНОЧНЫХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ

Подкомитетом по волчаночным антикоагулянтам/AT к фосфолипидам Международного общества по тромбозам и гемостазу в 1995 г. были внесены поправки в предложенные ранее 4 основных критерия для определения волчаночных антикоагулянтов (ВА). Согласно новым рекомендациям, об определении ВА можно судить, если наблюдают каждый из следующих признаков:

- 1) удлинение как минимум одного из фосфолипидзависимых тестов свертывания;
- 2) наличие ингибирования в тестах по смешиванию плазмы больного с пулом нормальных плазм;
- 3) доказана зависимость ингибирования от фосфолипидов. Для этого может использоваться изменение концентрации или состава фосфолипидов;
- 4) тщательно отдифференцированы ВА от других лабораторных показателей при других коагулопатиях. Для этого могут оказаться необходимыми специфические исследования факторов свертывания.

АТ к фосфолипидам обнаруживают при многих заболеваниях, поэтому определение ВА может быть актуальной задачей в клиниках широкого профиля. Сложность проблемы заключается в том, что не существует ни одного метода, который обеспечивал бы близкую к 100% чувствительность тестов. Это обусловлено как разнообразием свойств образующихся АТ, которые теоретически могут ингибировать любую из фосфолипидзависимых реакций, так и сложной природой реакций системы гемостаза.

СКРИНИНГОВЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВА

1. Тесты свертывания ядом змеи Рассела (*Vipera russelli*) или тайпана (*Oxyuranus scutellatus*), содержащих ферменты, активирующие на поверхности фосфолипидов фактор X и протромбин соответственно;
2. АЧТВ с увеличенным временем инкубации и/или разбавленным реактивом;
3. Тест с разбавленным тромбопластином (ингибирование тромбопластина);
4. Каолиновое (или силикатное) время.

Если хотя бы один из двух скрининговых тестов (ПТ и АЧТВ) позволяет выявить удлинение времени свертывания, а ТВ нормальное, то это можно рассматривать как важный аргумент в пользу подозрений на ВА. Учитывая невысокую чувствительность к ВА скрининговых тестов в стандартной постановке, при всяком подозрении на наличие таких АТ необходимо выполнение 4 скрининговых тестов, обладающих более высокой чувствительностью к ВА. Порядок выполнения может соответствовать порядку перечисления (тесты расположены в порядке снижения чувствительности или специфичности), но не обязательно. При получении первого аномального результата необходимо перейти от скрининговых к подтверждающим тестам, которые должны показать или исключить связь с зависимостью от фосфолипидов. Для дифференцировки между этой патологией и дефицитом факторов и/или наличием ингибиторов к ним необходимо выполнение исследования на смеси плазмы больного с донорской с применением метода, выявившего аномалию. Возможная схема исследования представлена на рис. 2.11.

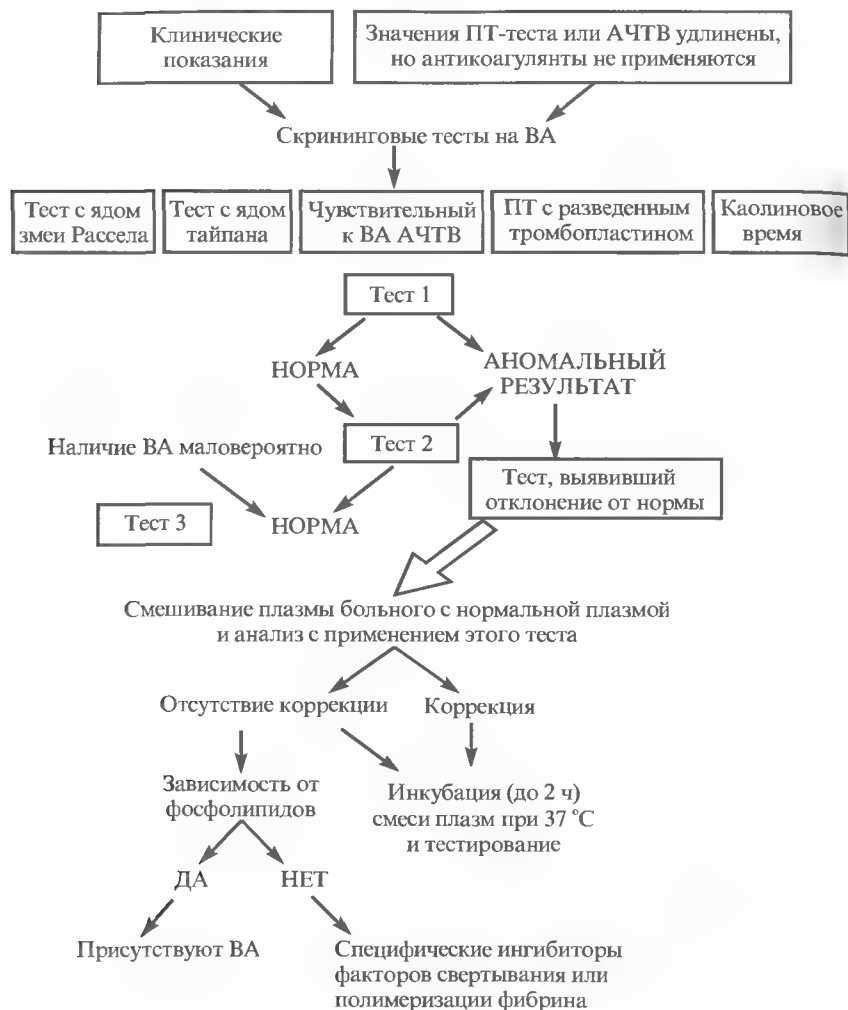


Рис. 2.11. Примерная схема анализов при подозрении на наличие волчаночного антикоагулянта. Для исключения необходимо выполнение не менее 2 скрининговых тестов.

Чаще всего плазму больного и нормальной донора смешивают в равной пропорции. Увеличение доли плазмы больного в смеси повышает чувствительность, но снижает специфичность. За отсутствие коррекции принимают результат, превышающий

средние значения теста на 2–3 стандартных отклонения. Предложена следующая формула для вычисления индекса коррекции тестов каолинового времени и ингибирования тромбопластина:

$$\frac{b - c}{a} \times 100,$$

где a — время свертывания плазмы больного; b — время свертывания смеси плазм, c — время свертывания нормальной плазмы. Значения индекса коррекции, превышающие 15, рассматривают как свидетельство в пользу ВА. Примерно в 1/3 выявляемых случаев ВА проявляются как прогрессивные ингибиторы, и для их выявления необходима длительная (до 2 ч) инкубация смеси плазм при 37 °С. В этом случае в качестве контрольной плазмы используют смесь, приготовленную из этих плазм, инкубировавшихся раздельно в этих же условиях.

Если в экспериментах по смешиванию получены данные в пользу ВА, то следующим этапом исследования должно быть доказательство связи патологии с зависимостью от фосфолипидов. Для этого может выполняться исследование нейтрализации ингибитора синтетическими фосфолипидами или лизатами тромбоцитов, получаемых замораживанием и оттаиванием суспензии клеток. Плазму больного смешивают с равным объемом лизатов, а в качестве контроля используют плазму больного, разведенную в 2 раза раствором 0,9% NaCl.

2.5.9. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

В зависимости от результатов скрининговых тестов или клинических показаний может оказаться необходимым исследование отдельных компонентов системы гемостаза. Применяемые методы могут быть разделены на функциональные, основанные на определении специфической активности компонента, и иммунологические, в которых измеряют концентрацию Аг. Иммунологические методы незаменимы в тех случаях, когда исследуемый компонент не обладает легко измеряемой функциональной активностью. Кроме того, возможность применения в анализе комбинации 2 АТ, выработанных к разным антигенным детерминантам, и использование системы усиления сигнала открывают

практически неограниченные возможности этих методов. Именно благодаря иммунологическим методам существенно расширились возможности исследования активации системы гемостаза *in vivo*.

Большинство факторов системы свертывания может быть определено с использованием дефицитной по исследуемому фактору плазмы и одного из двух глобальных тестов. АЧТВ обычно применяют для определения факторов XII, XI, IX и VIII, а Са-тромбопластиновый тест — для определения факторов VII, X, V и протромбина. Особые подходы применяют для исследования факторов (фФВ и XIII), не определяемых в глобальных тестах.

Нелинейный характер зависимости времени свертывания от концентрации исследуемого фактора в этих тестах требует построения калибровочных графиков с использованием геометрического разведения стандарта, обычно от 1:10 до 1:100 и более. Для повышения точности определения рекомендуют использование разных разведений исследуемой плазмы. Это обусловлено тем, что в области высоких концентраций фактора отмечают низкую чувствительность, а в области низких концентраций возможно завышение из-за вклада остаточной активности или шунтирующих реакций. Особое внимание этому следует уделить при анализе с использованием Са-тромбопластина. Одна из причин высокой активности тромбопластина — наличие в препарате, получаемом из тканей, факторов свертывания. Пологий характер калибровочного графика свидетельствует о необходимости замены тромбопластина.

Определение фФВ возможно по его кофакторной активности в индуцируемой ристоцетином агрегации тромбоцитов. Для количественного определения используют иммунологические методы или сравниваются скорости агрегации отмытых от плазмы тромбоцитов, суспендированных в разведениях исследуемой и нормальной плазмы. Можно использовать не только свежely деленные тромбоциты, но и клетки, фиксированные 2% раствором формальдегида.

Для полуколичественного определения фактора XIII (более точного определения обычно не требуется) к разведениям нормальной плазмы и плазмы больного добавляют очищенный (не содержащий фактора XIII) фибриноген, тромбин и CaCl_2 . По-

сле инкубации в течение 30 мин при 37 °С сгусток аккуратно отделяют от стенок, в пробирку вносят 8-кратный объем 5% монойодуксусной кислоты и через 5 мин инкубации при 37 °С проверяют наличие сгустков. Содержание фактора XIII вычисляют как соотношение максимального разведения плазмы больного к максимальному разведению контрольной плазмы, при которых в пробирке обнаруживают сгусток.

Значительный прогресс в исследованиях компонентов системы гемостаза был обеспечен разработкой хромогенных субстратов, представляющих собой р-нитроанилиды, как правило, трипептидов. Протеазы отщепляют от этих субстратов р-нитроанилин, обладающий достаточно высоким поглощением при 405 нм, что обеспечивает возможность прямого и простого определения большинства протеаз системы гемостаза, их кофакторов и ингибиторов.

К несомненным преимуществам хромогенных субстратов относят также возможность исследования отдельных стадий последовательных превращений при минимальном влиянии других реакций, чего трудно избежать в глобальных тестах, где измеряют конечные стадии — образование или растворение фибрина.

В то же время взаимодействие хромогенных субстратов с протеазами в отличие от белковых определяется в основном структурой активного центра. Поэтому амидолитическая и протеолитическая активность протеаз может существенно различаться. Например, β - и γ -тромбины, а также комплекс тромбин–тромбомодулин обладают сходной с α -тромбином амидолитической активностью, но их свертывающая активность в отношении фибриногена на 2 порядка ниже, чем у α -тромбина. Комплексы протеаз с α_2 -макроглобулином не обладают протеолитической активностью, но расщепляют хромогенные субстраты. Плазмин и комплекс стрептокиназа–Пг обладают сходной специфичностью в отношении хромогенных субстратов, но значительно отличаются по протеолитической активности. Эти примеры свидетельствуют о том, что протеазы, как правило, менее требовательны к хромогенным субстратам, чем к белковым. Можно привести и пример другого рода. Одноцепочечная

урокиназа расщепляет Пг, хотя и с низкой скоростью, но не обладает амидолитической активностью.

На основе хромогенных субстратов разработаны методы определения большинства компонентов системы гемостаза, а также и варианты двух глобальных коагуляционных тестов — протромбинового и АЧТВ. Однако преимущества хромогенных субстратов наиболее заметно выявляются при определении компонентов систем противосвертывания и фибринолиза.

2.5.10. АНТИТРОМБИН III

Антитромбин III определяют по ингибированию тромбина или фактора X_a . Принцип метода состоит в определении остаточной активности фермента после инкубации в присутствии гепарина избытка фермента с разведенной плазмой. Определение остаточной активности тромбина возможно с помощью хромогенных субстратов (фотометрические методы) или по скорости свертывания фибриногена (коагулометрические методы). К преимуществам определения по ингибированию фактора X_a относят отсутствие влияния на результат ГК-II. Его недостаток — необходимость добавления в состав реактивов гирудина или синтетических ингибиторов тромбина.

При определении антитромбина III по ингибированию тромбина желательно использовать фермент из плазмы быка, так как он более стабилен и менее чувствителен к ГК-II. Расчеты проводят по калибровочным графикам, для построения которых используют разведения стандартной плазмы. При фотометрических определениях обычно достаточно 3 разведений плазмы, соответствующих, например, 100, 50 и 25% от нормы. Из-за нелинейного характера зависимости времени свертывания фибриногена от остаточной активности тромбина для калибровки коагулометрического метода необходимо большее количество разведений плазмы.

При фотометрических определениях альтернативным вариантом расчета служит определение исходной активности фермента, из которой вычитают остаточную активность, а разницу умножают на коэффициент, представляющий собой дробь (числитель — активность ингибитора в референтной плазме, знаменатель —

разница между исходной активностью фермента, измеренной после инкубации фермента с 0,9% NaCl вместо плазмы, и активностью, измеренной после инкубации фермента с референтной плазмой).

К недостаткам этого метода относят то, что из-за высокой стоимости хромогенных субстратов производители реактивов обычно дают минимально возможную концентрацию субстрата. Вследствие этого измеренная величина исходной (максимальной) активности фермента может быть ниже истинной, что приведет к занижению всех результатов определения. В то же время при построении калибровочного графика максимальное разведение плазмы можно ограничить точкой, соответствующей 25% содержания антитромбина III. Остаточная активность тромбина при этом будет ниже исходной и ближе к истинному значению (субстрат меньше израсходуется за время реакции), что повысит точность определения.

2.5.11. ПРОТЕИН С

Наиболее удобный метод определения ПрС — измерение его функциональной активности после активации ферментом из яда *Agkistrodon contortrix*. Этот фермент, получивший название «протак», оказался очень удобным инструментом для определения ПрС. Высокоочищенные препараты этого фермента активируют ПрС в отсутствие Ca^{2+} с высокой скоростью, но не расщепляют ни такие белки плазмы, как фибриноген и факторы V и VIII, ни хромогенные субстраты ПрС. Это позволяет использовать протак как для коагулометрического, так и для фотометрического определения ПрС.

Коагулометрическое измерение ПрС основано на определении остаточной активности фактора VIII в субстратной плазме после инкубации с исследуемой плазмой в присутствии активатора, состоящего из АЧТВ-реактива и протака. Смесь достаточно сложная, и точность определения во многом зависит от строгого соблюдения условий реакции. Кроме того, высокое содержание фактора VIII в исследуемой плазме может приводить к занижению результата определения.

Более просты метод активации ПрС протактом и прямое определение ПрС_а по величине амидолитической активности. Однако протакт активировывает и неполноценный ПрС, образующийся в условиях дефицита витамина К, что может приводить к несоответствию между активностью ПрС_а, определяемой этим методом, и его истинной антикоагулянтной активностью. Нельзя исключить также и возможность несоответствия амидолитической и антикоагулянтной активности ПрС_а при некоторых генетических дефектах ПрС. В этом плане фотометрический метод определения ПрС, активированного протактом, следует рассматривать как полуфункциональный и по значимости сопоставимый с методами ИФА.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АКТИВИРОВАННОМУ ПРОТЕИНУ С

Для определения резистентности к ПрС_а исследуют влияние добавления стандартного количества ПрС_а на АЧТВ плазмы больного. При необходимости определения резистентности к ПрС_а у больных, находящихся на лечении гепарином или антагонистами витамина К, плазму больного разводят дефицитной по фактору V плазмой.

В подавляющем большинстве врожденных случаев резистентность к ПрС_а обусловлена мутацией по 1691 нуклеотиду (G→A) гена фактора V. Для обнаружения этой мутации из лейкоцитов экстрагируют ДНК и фрагмент, содержащий участок мутации, амплифицируют в полимеразной цепной реакции. Синтезированная ДНК расщепляется рестриктазой и анализируется с помощью ЭФ. Наличие замены G→A приводит к изменению числа и размера образующихся фрагментов.

2.5.12. ПРОТЕИН S, ПЛАЗМИНОГЕН, α_2 -АНТИПЛАЗМИН И ТКАНЕВЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА

Определение ПрS возможно с помощью ИФА и коагулометрического теста, основанного на определении его кофакторной активности в инактивации фактора V_a под действием ПрС_а. Активированный фактор V_a характеризуется низкой стабильностью, а в условиях *in vitro* ПрS ускоряет его инактивацию лишь в 2–3 раза. Поэтому точное определение ПрS в коагулометрическом тесте требует очень строгого соблюдения условий реакций.

В зависимости от специфичности применяемых АТ с помощью ИФА может определяться как свободный, так и суммарный (свободный + связанный с С4b-связывающим белком компонента) ПрS.

Наиболее удобный метод определения Пг — измерение амидолитической активности комплекса Пг–стрептокиназа. Стрептокиназа связывает Пг с высоким сродством и открывает в нем активный центр, расщепляющий хромогенные субстраты. К уникальным свойствам человеческого Пг относят высокую устойчивость его комплексов со стрептокиназой к белковым ингибиторам плазмы, что в большинстве случаев позволяет прямо определять Пг по скорости расщепления хромогенного субстрата плазмой после добавления избытка стрептокиназы. Для расчета используют калибровочный график или произведение значения $\Delta A_{405}/\text{мин}$ и коэффициента. Способ расчета принципиального значения не имеет. Однако в некоторых случаях амидолитический метод определения Пг может давать ошибочные результаты.

Основная проблема — завышение результата определения в образцах плазмы с высоким уровнем фибриногена или продуктов его разрушения. Эту ошибку можно устранить введением в среду реакции очищенного (не содержащего Пг) фибриногена.

Более сложная проблема — точное определение Пг при тромбозе. В первые часы тромболитической терапии содержание Пг (профермента) резко снижается, а вклад его производных (комплексов со стрептокиназой и/или плазмин- α_2 -макроглобулин) в суммарную амидолитическую активность плазмы увеличивается. При тромбозе урокиназой или тАП основным считают вклад комплексов с α_2 -макроглобулином, который может быть легко учтен путем вычитания из суммарной активности той активности, которая измеряется после замены стрептокиназы соответствующим буферным раствором.

Для определения α_2 -АП к плазме добавляют избыток плазмина, а остаточную активность фермента измеряют с помощью хромогенных субстратов. Инактивация плазмина α_2 -АП протекает очень быстро. Для уменьшения относительного вклада других ингибиторов желательно сокращать до минимума время инкубации плазмы с плазмином и определять начальную скорость хромогенной реакции. Для расчетов лучше использо-

вать калибровочный график, построенный с использованием 3 разведений плазмы. Стабильность плазмينا в буферах с нейтральными или щелочными значениями pH невысокая. Для повышения стабильности плазмينا в буферы часто добавляют глицерин. Работа с такими растворами, обладающими высокой вязкостью и плотностью, требует особой аккуратности при пипетировании и тщательного перемешивания после внесения в кювету.

Определение активности тАП в плазме больных — сложная задача. Сложность обусловлена двумя причинами. Во-первых, в норме концентрация тАП в плазме ниже, чем его быстрое действующего ингибитора, и активатор, секретируемый эндотелием, быстро нейтрализуется. Во-вторых, кроме тАП, Пг могут активировать урокиназа, компоненты контактной фазы системы свертывания и фактор XI_a. Хотя скорость активации Пг этими компонентами намного ниже, чем тАП или урокиназой, их концентрация в плазме значительно выше, чем активаторов, поэтому они могут вносить существенный вклад в определяемую *in vitro* активацию Пг.

Для определения тАП кровь немедленно после забора смешивают с 1/2 объема 0,5 М Na-ацетатного буфера pH 3,9 и центрифугируют. Закисление предотвращает инактивацию тАП. Прямое определение тАП в плазме с использованием хромогенных субстратов невозможно из-за низкого содержания активатора и невысокой селективности субстратов. Для повышения чувствительности и специфичности закисленную плазму вносят в буфер, содержащий Пг, кофактор (фибрин-мономеры или B γ CN-фрагменты фибриногена) и хромогенный субстрат. В смеси одновременно протекают две реакции: образование плазмينا и расщепление образующимся плазмином хромогенного субстрата. Графики нарастания A₄₀₅ имеют вид параболы. Их можно линеализовать в координатах A₄₀₅ от t² и по наклону определить скорость образования плазмينا, но обычно определяется увеличение поглощения за фиксированный промежуток времени (~1 ч). Активность тАП выражают в международных единицах (МЕ/мл), вычисляемых как соотношение ΔA_{405} в исследуемых образцах/ ΔA_{405} стандарта тАП, умноженное на активность стандарта.

2.5.13. ИНГИБИТОР АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

Для определения активности ИАП исследуемую плазму инкубируют в течение 10 мин с избытком активатора. Затем смесь закисляют добавлением равного объема 0,5 М Na-ацетатного буфера pH 3,9, а остаточную активность активатора определяют так, как описано выше. Активность ИАП выражают в условных единицах (УЕ/мл). За 1 УЕ принимают такое количество ингибитора, которое нейтрализует 1 МЕ активатора. Для определения активности ИАП может использоваться как тАП (определяют только ИАП-1), так и урокиназа (определяют сумму ИАП-1 и ИАП-2). Для расчета активности ингибитора используют либо калибровочный график, либо формулу:

$$\text{Ингибитор} \left(\frac{\text{УЕ}}{\text{мл}} \right) = \frac{A_{\text{станд.}} - A_{\text{образца}}}{A_{\text{станд.}}} \times \text{Активность стандарта} \left(\frac{\text{МЕ}}{\text{мл}} \right).$$

При построении калибровочного графика ингибирование активатора моделируют разведением стандарта дефицитной по ингибитору плазмы.

2.5.14. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

На основе АТ разработаны как качественные и полуколичественные экспресс-методы, так и высокочувствительные системы ИФА. АТ фактически незаменимы для определения компонентов, не обладающих легко измеряемой активностью. Таковы, например, маркеры фибринообразования, расширяющие возможности неинвазивной диагностики венозных тромбозов и тромбоэмболий, и активации свертывания, позволяющие определить состояние гиперкоагуляции и контролировать эффективность терапии. Использовать ИФА очень удобно при серийных определениях большого количества образцов. В то же время вряд ли стоит рекомендовать эти методы для определения тех компонентов, которые легко могут быть измерены с помощью функциональных тестов. Более того, уровень Аг фактора может не совпадать с уровнем его функциональной активности, что важно для исследования некоторых заболеваний. Примером могут быть тип II

дефицита антитромбина III или ПрС, а также соотношение между Аг тАП и его активностью.

Ранний маркер активации фибринообразования — фибрин-мономер. Паракоагуляционные протамин-сульфатный и этаноловый тесты обладают низкой чувствительностью и специфичностью. Для более точного определения были предложены качественный метод, основанный на агглютинации эритроцитов, покрытых фибрин-мономерами, и количественный по кофакторной активности фибрин-мономера в активации Пг тАП метод.

Маркер сформированных тромбов в венозной системе, создающих угрозу тромбоэмболий, — D-димер. К важной характеристике этого маркера относят высокую достоверность положительного результата. D-димер в отличие от других маркеров активации не может образоваться вследствие ошибки при заборе крови (разумеется, если анализ не проводят спустя несколько часов после образования сгустка). Для полуколичественного определения D-димера используют тест по агглютинации частиц латекса, покрытых моноклональными АТ, реагирующими только с областью сшивки D-доменов. Для этого теста используют плазму больного. Более быстрым и чувствительным является тест, основанный на применении биспецифических АТ, взаимодействующих с областью сшивки и поверхностным белком мембран эритроцитов. В присутствии D-димеров эти АТ вызывают агглютинацию собственных эритроцитов больного. Тест выполняют на цельной капиллярной крови, что позволяет получить результат через несколько минут после взятия крови.

Использование двух АТ, взаимодействующих с разными антигенными детерминантами, позволяет определять с помощью ИФА не только исходные белки, но и их фрагменты и нео-Аг, образующиеся в результате сшивания, расщепления или взаимодействия с ингибиторами.

Диапазон возможностей метода может быть продемонстрирован на примере фибриногена и его производных. С помощью ИФА можно определять: только интактный фибриноген (первые АТ взаимодействуют с С-концевым доменом α -цепей, вторые — с фибринопептидом А); активацию фибриногена тромбином — фибрин-мономер, или фибринопептид А; ранние продукты разрушения фибриногена плазином (X-фрагменты или

пептид $\beta 1-42$); поздние продукты разрушения фибриногена (D- и E-фрагменты) и фибрина (D-димер).

Благодаря ИФА стало возможным определение: активированных форм факторов XII и XI; пептидов активации факторов IX, X, протромбина и ПрС; протеаз, инактивированных ингибиторами (тромбин–антитромбин III, ПрС_a-ИАП-3/ α_1 -антитрипсин, плазмин- α_2 -АП, тАП-ИАП-1). Естественно, что для селективного определения следов модифицированных белков при многократно превосходящей концентрации исходных форм необходимы АТ высокой специфичности.

В основе всех регуляторных процессов в организме человека находятся нервная система и железы внутренней секреции. Свою функцию они осуществляют путем секреции соответственно нейромедиаторов и гормонов.

Гормоны секретируются в эндокринных железах, т.е. в тканях, протоки которых выводятся в кровеносную (главным образом в вены) или лимфатическую систему. Нейромедиаторы синтезируются в теле нейрона или в нервных окончаниях и, как правило, скапливаются в так называемых синаптических пузырьках.

В состоянии покоя происходит спонтанная, с определенной частотой и определенными порциями секреция нейромедиаторов и гормонов. Разрыв синаптического пузырька приводит к выделению в синапс всего его содержимого. В каждом пузырьке содержится приблизительно одинаковое количество нейромедиаторов, поэтому принято говорить о выделении дробного числа квантов нейромедиаторов. Катехоламины и многие белково-пептидные гормоны также секретируются в кровь определенными порциями, так как данные гормоны, подобно нейромедиаторам, секретируются путем опустошения везикул. В состоянии покоя это опустошение происходит самопроизвольно с низкой частотой. Регуляторный сигнал, стимулирующий эндокринную железу, увеличивает частоту опустошения везикул, что приводит к секреции большего количества нейромедиатора или гормона. Ингибирующее влияние на секрецию осуществляется путем снижения частоты выброса гормона или нейромедиатора.

В отличие от катехоламинов и белково-пептидных гормонов стероидные гормоны, по-видимому, не накапливаются в специ-

альных структурах клетки, а благодаря своей липофильности свободно проходят через плазматическую мембрану клеток эндокринной железы и попадают в кровь. Регуляция функциональной активности желез, в которых образуются стероидные гормоны, сводится лишь к ускорению или замедлению синтеза этих гормонов. Следует отметить, что факторы, стимулирующие или ингибирующие секреторную активность желез, соответственно ускоряют или замедляют также и биосинтез гормонов. Это осуществляется по механизму обратной связи.

Время появления гормонального эффекта определяется тем, когда поступит сигнал на соответствующую железу внутренней секреции. Сколь велик будет эффект гормона, зависит от силы этого сигнала.

В ряде случаев функциональная активность железы регулируется субстратом, на который направлено действие гормона. Так, например, глюкоза стимулирует секрецию инсулина из островков Лангерганса, а инсулин понижает концентрацию глюкозы, облегчая ее транспорт в ткани, и тем самым устраняет стимулирующее влияние сахара на поджелудочную железу.

По такому же механизму осуществляется секреция ПТГ и кальцитонина.

Эта регуляция, происходящая по механизму отрицательной обратной связи, очень эффективна для поддержания гомеостаза в организме. Задачи адаптации организма не могут быть решены с помощью этого механизма. Так, например, кора надпочечников должна производить глюкокортикоиды в ответ на голод, болезни, эмоциональное возбуждение и т. п. Очевидно, что для того чтобы эндокринная система могла отвечать на эти изменения в организме, а также на свет, звуки, запахи, должна существовать связь между эндокринными железами и нервной системой.

Наиболее простым примером подобной связи является регуляция клеток мозгового слоя надпочечников нервными волокнами. В мозговом слое надпочечников образуется адреналин и в меньшей степени норадреналин. Электрические сигналы, идущие по нервным волокнам, через синаптическую передачу (нейромедиатор ацетилхолин) активируют клетки мозгового слоя надпочечников и вызывают в них синтез и секрецию катехоламинов. Однако такой способ замыкания нейроэндокринных связей

является скорее исключением, чем правилом. Клетки мозгового слоя надпочечников можно рассматривать как переродившуюся нервную ткань, а такую регуляцию — как сохранившуюся связь между нервными клетками.

3.1. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ НЕРВНОЙ И ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМАМИ

Основные связи между нервной и эндокринной системой регуляции осуществляются с помощью специальных отделов мозга — гипоталамуса и гипофиза. Нервные сигналы, приходящие в гипоталамус, активируют секрецию так называемых релизинг-факторов: тиреолиберина, соматолиберина, пролактолиберина, гонадолиберина и кортиколиберина, а также соматостатина и пролактостатина (рис. 3.1). Мишенью либеринов и статинов, секретируемых гипоталамусом, является гипофиз. Каждый из либеринов взаимодействует с определенной популяцией клеток гипофиза и вызывает в ней синтез соответствующих тропинов: тиреотропина, соматотропина (гормона роста), пролактина, гонадотропинов (два гормона — лютеинизирующий и фолликулостимулирующий), а также адренокортикотропного гормона (АКТГ). Влияние на гипофиз статинов противоположное — они подавляют секрецию тропинов.

Роль тропинов, секретируемых гипофизом, заключается в регуляции соответствующих эндокринных желез. С током крови тропины попадают на соответствующие железы и активируют в них секреторные процессы.

В этой системе передачи сигнала от ЦНС до эндокринных желез на каждой ступени происходит увеличение количества секретируемого гормона. Последовательное участие в этом процессе нескольких эндокринных желез обеспечивает интеграцию регуляторных воздействий, так как секреторная активность каждой из этих желез зависит не только от гормональных и нервных стимулов, но и от таких факторов, как концентрация субстрата и кофакторов синтеза, состояние биосинтетического аппарата, обеспеченность энергией и т.п. Несомненно также, что многоступенчатость этой системы исключает реагирование эндокрин-

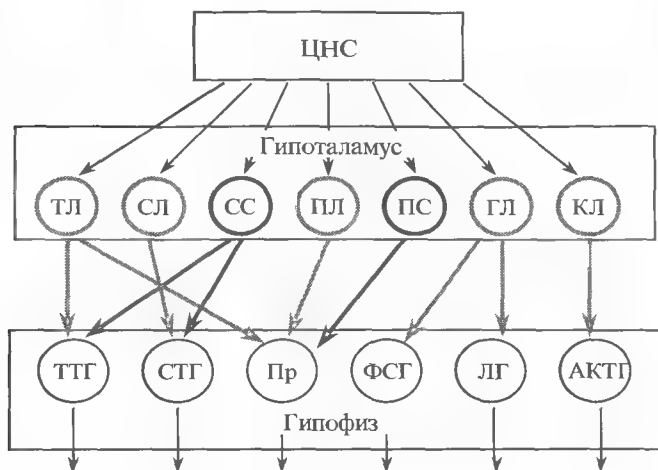


Рис. 3.1. Регуляция эндокринных желез ЦНС. ТЛ, СЛ, ПЛ, ГЛ и КЛ — соответственно, тиреолиберин, соматолиберин, пролактолиберин, гонадолиберин и кортиколиберин. СС и ПС — соматостатин и пролактостатин. ТТГ — тиреотропный гормон, СТГ — соматотропный гормон (гормон роста), Пр — пролактин, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, ЛГ — лютеинизирующий гормон, АКТГ — адренокортикотропный гормон.

ной системы по принципу «все или ничего», позволяет регулировать силу сигнала, усиливая или ослабляя его в зависимости от состояния организма.

Еще одна особенность этой эстафетной системы проведения сигнала заключается в том, что одним стимулом можно вызвать образование нескольких разных гормонов, т.е. запустить несколько регуляторных сигналов. Так, например, при стрессе стимулируется следующий путь нейроэндокринной регуляции: гипоталамус–кортиколиберин–гипофиз–АКТГ–надпочечник–кортизол. АКТГ — это полипептид, состоящий из 39 аминокислот, который образуется из белка-предшественника путем его протеолиза (рис. 3.2). Помимо АКТГ, из С-концевой части белка-предшественника образуется еще один пептид — β -липотропный гормон (ЛТГ), дальнейший протеолиз которого приводит к образованию либо γ -ЛТГ и β -эндорфина, либо β -меланоцит-стимулирующего гормона (МСГ) и γ -эндорфина. Образующийся

при стрессе β -ЛТГ несет в своей структуре также последовательность α -эндорфина и мет-энкефалина. Следовательно, при стрессе за счет протеолиза одного и того же белка может образовываться несколько нейропептидов, в том числе и так называемые эндогенные опиоиды (эндорфины и энкефалины). Эти гормоны дают обезболивающий эффект и чувство эйфории при связывании с опиоидными рецепторами, теми самыми, на которые действуют морфиноподобные наркотики.

Возникновение нескольких регуляторных сигналов под влиянием всего одного стимула позволяет организму одновременно изменять целый спектр своих функций, например в случае стресса активировать обмен углеводов (глюкокортикоиды) и липидов (липотропины), а также уменьшать чувство боли (эндорфины и энкефалины), стимулировать иммунную систему (МСГ).

Приведенные выше примеры свидетельствуют о том, что передача регуляторного сигнала от одних клеток к другим происходит путем умножения сигнала. При этом в ответ на одно воздействие образуется, как правило, не один, а несколько гормонов, каждый из которых имеет свои рецепторы на клетках и, связываясь с ними, вызывает свой спектр биологических эффектов.

Гипоталамус состоит из специализированных нервных клеток, аксоны которых содержат в синаптических пузырьках либерины или статины. Возбуждение аксонов приводит к выбросу рилизинг-факторов из синаптических пузырьков. Они попадают в портальную вену, а затем на клетки гипофиза.

Перерезка ножки гипофиза приводит к потере связи между гипоталамусом и гипофизом. При этом секреция тиреотропного, соматотропного, гонадотропных гормонов и АКТГ понижается, а секреция пролактина возрастает.

Каждый из тропинов синтезируется строго определенной группой клеток гипофиза. При этом каждая из этих групп клеток находится под контролем определенного участка гипоталамуса. Так, например, задний отдел гипоталамуса стимулирует в гипофизе секрецию АКТГ, а передний отдел гипоталамуса — секрецию тиреотропного гормона.

Гормоны гипоталамуса и гипофиза — это в основном пептиды, полипептиды и белки. Полупериод их жизни в крови составляет 2–5 мин.

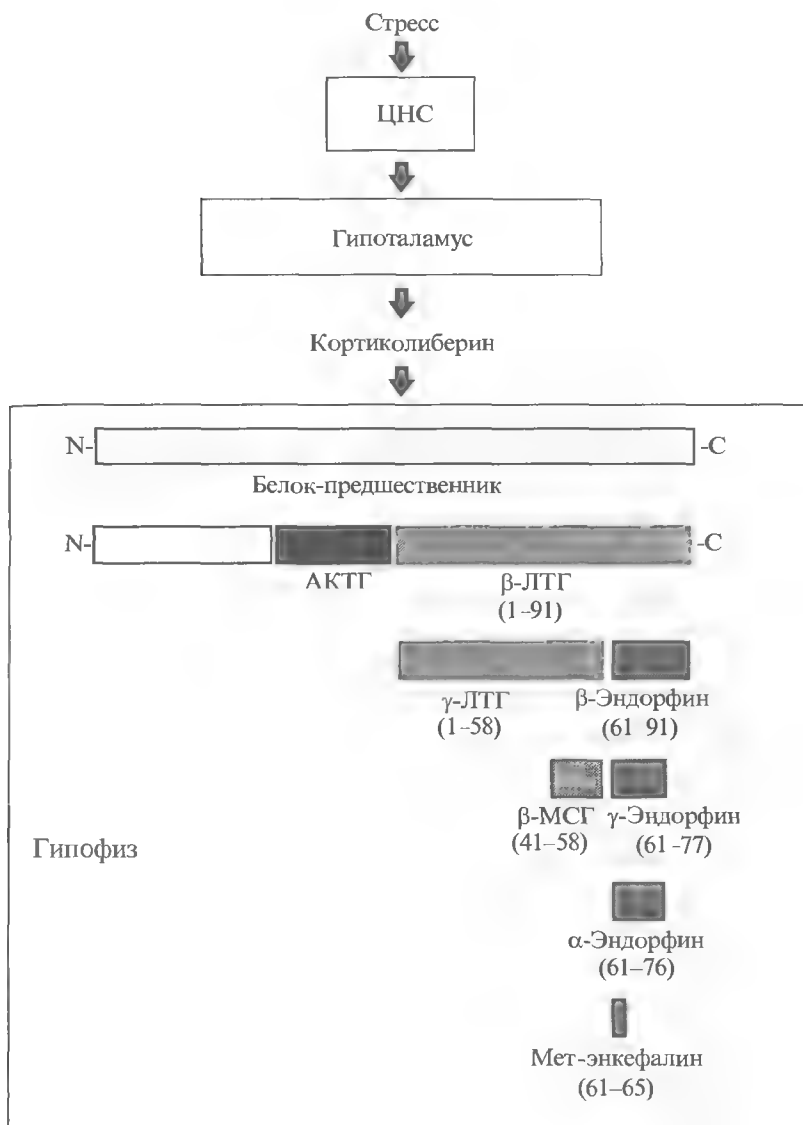


Рис. 3.2. Образование белковых и пептидных гормонов в гипофизе из общего белка-предшественника под действием стресса. ЛТГ — липотропный гормон, МСГ — меланоцитстимулирующий гормон.

Самый большой из либеринов — это соматолиберин, состоящий из 15 аминокислотных остатков, самый маленький — трипептид тиреолиберин. В качестве рилизинг-факторов выступают также гипоталамические дофамин и норадреналин.

Разные тропины, образующиеся в гипофизе, содержат от 13 до 198 аминокислотных остатков. Лютеинизирующий, фолликулостимулирующий гормоны и тиреотропин — это гликопротеиды, состоящие из 2 разных субъединиц. За связывание с рецептором и проявление биологического эффекта гормона ответственны β -субъединицы, а α -субъединицы у всех 3 гормонов идентичны, и их роль, по-видимому, сводится к защите β -субъединиц от протеолиза.

Основные эффекты либеринов, статинов и тропинов опосредуются активацией синтеза цАМФ. Эффекты же гормонов, образование и секреция которых находится под контролем тропинов, осуществляется путем изменения скорости синтеза белка (тиреоидные и стероидные гормоны).

Кроме регуляторных сигналов, идущих сверху вниз, существует регуляция гипофиза и гипоталамуса гормонами исполнительных желез. Обычно соблюдается следующая закономерность: при дистрофии эндокринной железы в гипофизе стимулируется секреция соответствующего тропного гормона, при гиперфункции железы секреция соответствующего тропина подавляется.

Эта обратная связь позволяет не только осуществлять тонкую регуляцию уровня гормонов в крови, но и участвует в дифференцировке гипоталамуса. Известно, что образование половых гормонов в женском организме происходит циклически, что объясняется циклической секрецией гонадотропных гормонов. Под действием фолликулостимулирующего гормона происходит развитие фолликулов. Затем секретруется лютеинизирующий гормон, который вызывает образование желтого тела — временной эндокринной железы, производящей эстрогены. Причина циклической секреции гонадотропинов кроется не в гипофизе, который синтезирует эти гормоны, а в гипоталамусе, образующем рилизинг-фактор этих тропинов (гонадолиберин). Если самке пересадить гипофиз самца, он тоже начинает работать циклично. Половая дифференцировка гипоталамуса происходит

под действием андрогенов. Если самца лишить этих половых гормонов, то гипоталамус будет дифференцироваться по женскому типу.

Активность гипоталамуса контролируется также эпифизом — еще одной эндокринной железой, расположенной в мозге. Многие ферментные и секреторные процессы в нем протекают с цикличностью, равной световому и темновому периодам суток. Эта регуляция осуществляется следующим образом. Кванты света, попадая на свой рецептор — родопсин, локализованный в наружных сегментах палочек сетчатки, вызывают возникновение потенциала действия, который распространяется по зрительному нерву и, в частности, активирует нервные волокна, иннервирующие эпифиз. Через эти волокна осуществляется торможение синтеза белка в эпифизе, в частности синтеза метилазы, участвующей в образовании мелатонина. В темное время суток растет концентрация метилазы и поэтому возрастает образование мелатонина из серотонина. Мелатонин участвует в регуляции окраски кожи (вызывает ее просветление), подавляет эффекты гонадотропинов и влияет на секрецию рилизинг-факторов в гипоталамусе.

Мелатонин образуется только в эпифизе. В других тканях (нейроны, слизистая оболочка желудка и кишечника, тучные клетки, печень и почки) нет этой специфической метилазы, а гидроксилирование и декарбоксилирование триптофана приводят к образованию серотонина (5-окситриптамина) (рис. 3.3). Этот гормон регулирует функции многих клеток, но в эпифизе серотонин является промежуточным веществом биосинтеза мелатонина. Свет, подавляя активность метилазы в эпифизе, замедляет превращение серотонина в мелатонин. Сигнал от зрительных клеток на эпифиз передается через нервные волокна, которые секретируют катехоламины. При этом, в частности, повышается концентрация цАМФ — внутриклеточного регулятора, стимулирующего ферменты синтеза серотонина из триптофана, но не влияющего на активность метилаз. В результате всех этих процессов в светлое время суток в эпифизе повышена концентрация серотонина, а в темное — мелатонина.

Принято считать, что существует также сезонная и годовичная циклическая активность эпифиза. Очевидно, что, воздействуя

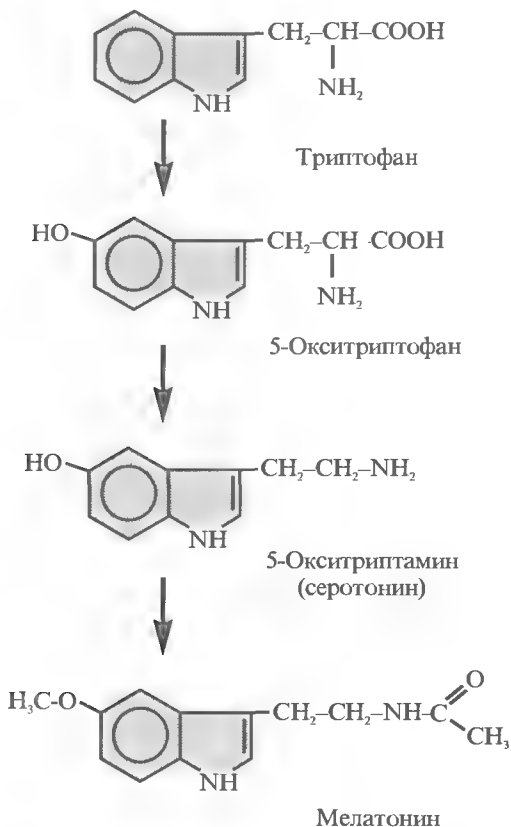


Рис. 3.3. Биосинтез серотонина и мелатонина.

на гипоталамус, гормоны эпифиза могут задавать цикличность многим другим железам. Так, например, в темное время суток секреция пролактина выше, чем в светлое время. Это не связано ни со сном, ни с бодрствованием организма. Показано также, что нарушения циклической активности эпифиза, происходящие при частой перемене временных поясов или при экспериментальном изменении длительности «дня» и «ночи», могут приводить к нарушениям циклической секреции гонадотропинов и половых гормонов.

По-видимому, существует лишь 3 эндокринных железы, функциональная активность которых находится под прямым

контролем нервных механизмов регуляции: мозговой слой надпочечников, эпифиз и гипоталамус. Все остальные железы находятся под гуморальным контролем. В таких железах могут быть иннервированы только сосуды, а эндокринные клетки изменяют свою биосинтетическую и секреторную активность лишь под действием определенных метаболитов, кофакторов и гормонов, поступающих к ним с током крови и лимфы. Следует отметить, что, помимо тропинов, регуляторами эндокринных желез могут быть и другие гормоны. Так, например, глюкагон стимулирует секрецию инсулина, а инсулин — секрецию катехоламинов, ангиотензин II стимулирует синтез и секрецию альдостерона. Отметим также, что некоторые гормоны гипоталамуса и гипофиза могут образовываться и в других тканях и там выполнять свои специфические функции. Так, например, соматостатин — гормон гипоталамуса, ингибирующий образование и секрецию гормона роста, обнаружен также в поджелудочной железе, где он подавляет секрецию инсулина и глюкагона.

Эти примеры ни в коей мере не умаляют значения гипоталамо-гипофизарного механизма регуляции. Подавляющее большинство нервных и гуморальных путей регуляции сходится на уровне гипоталамуса и благодаря этому в организме образуется единая нейроэндокринная система. К клеткам гипоталамуса подходят аксоны нейронов, расположенных в коре больших полушарий, в спинном, продолговатом и среднем мозге, таламусе и т. д. Эти аксоны секретируют норадреналин, дофамин, серотонин и другие нейромедиаторы, оказывающие на секреторную активность гипоталамуса как активирующее, так и ингибирующее влияние. Как отмечалось выше, гипоталамус испытывает также влияние многих гуморальных факторов. Поступающие из мозга нервные импульсы эта железа превращает в эндокринные стимулы, которые могут быть усилены или ослаблены в зависимости от гуморальных сигналов, поступающих на гипоталамус от желез, ему подчиненных.

Нельзя не отметить и уникальную роль гипофиза в нейрогуморальной регуляции. Тропины, образующиеся в гипофизе, не только регулируют подчиненные железы, но и имеют самостоятельные эндокринные эффекты. Так, например, помимо регуляции образования и экскреции молока, пролактин влияет на

процессы дифференцировки клеток, повышает чувствительность половых желез к гонадотропинам, стимулирует родительский инстинкт. АКТГ — это не только стимулятор стероидогенеза, но и важный регулятор липолиза в жировой ткани, а также предшественник α -МСГ и пептида (фрагмент 4–10), участвующего в консолидации памяти (превращение кратковременной памяти в долговременную). Гормон роста может регулировать активность иммунной системы, обмен липидов, сахаров и т. д.

В задней доле гипофиза (этот отдел называют также нейрогипофизом) депонируется антидиуретический гормон (вазопрессин) и окситоцин (рис. 3.4). Первый вызывает задержку воды в крови и повышает тонус сосудов, второй стимулирует сокращение матки при родах и секрецию молока. Оба гормона синтезируются в клетках гипоталамуса, затем транспортируются по аксонам в заднюю долю гипофиза и там секретируются.



Рис. 3.4. Пептидные гормоны окситоцин и вазопрессин.

Интересно, что одна из форм антидиуретического гормона (лизин-вазопрессин) имеет дополнительную функцию — способ-

ствуется восстановлению памяти, облегчает процесс извлечения из памяти, акт воспоминания.

Рассматривая роль гормонов гипофиза, мы обнаруживаем, что они влияют на развитие инстинктов, поведение и память, т. е. на процессы, протекающие в высших отделах головного мозга. Известно, что и другие, не гипофизарные гормоны, могут влиять на ЦНС. Так, например, андрогены и эстрогены определяют половой инстинкт, многие поведенческие реакции. Все это свидетельствует о том, что нейроны, точно так же, как и другие клетки нашего организма, находятся под контролем гуморальной системы регуляции. Эта регуляторная система включает в себя также другие органы и ткани (печень, мышцы, почки, кровь и др.), которые имеют не только подчиненную, но и управляющую функцию, так как секретируют в кровь гормоны, простагландины, факторы роста, цитокины и другие биологически активные вещества, влияющие (в числе прочего) на работу мозга и желез внутренней секреции.

Объединение многих миллиардов нервных клеток человека в одну ткань — мозг — позволяет ему хранить наследственные инстинкты, формировать рефлексы, иметь память, интеллект и способность к творчеству. Своеобразная память присуща и другим тканям человека, например, существует врожденный и приобретенный иммунитет (память клеток крови), с помощью физических упражнений можно влиять на фенотип мышечных клеток, существуют упражнения, которые усиливают слух или обостряют обоняние и т. п. Подобное возможно за счет того, что клетки наших органов и тканей общаются между собой с помощью гормонов, простагландинов, лейкотриенов, цитокинов, молекул межклеточного узнавания (селективных, кадгеринов), факторов роста и др. Разнообразие регуляторных молекул, участвующих в межклеточной коммуникации, значительно больше, чем разнообразие нейромедиаторов, участвующих в функционировании нервной ткани. Число клеток, секретирующих гормоны и гормоноподобные вещества, также сравнимо с численностью нейронов в мозге, а механизмы передачи регуляторного сигнала от клетки к клетке очень похожи на те, которые мы наблюдали при рассмотрении гипоталамо-гипофизарной системы регуляции.

3.2. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ХЕМО- И МЕХАНОРЕЦЕПЦИЕЙ

Взаимодействие между системами хеморецепции и механорецепции удобно рассмотреть на примере клеток кровеносного сосуда. Изнутри сосуд покрыт монослоем эндотелиальных клеток, которые служат молекулярным ситом для всех веществ, растворенных в крови. Кроме того, они делают внутреннюю поверхность сосуда неадгезивной, т. е. препятствуют прилипанию клеток крови к сосудистой стенке. Очень важна также эндокринная функция эндотелиальных клеток.

Многие гормоны, имея гидрофильную природу, не могут проникать через эндотелиальный барьер в глубь сосуда, а затем достигать определенного органа (рис. 3.5). Они действуют на эндотелиальные клетки и вызывают в них образование новых межклеточных регуляторов: эндотелина (пептидный гормон) и тромбксана (простаноид, образующийся из арахидоновой кислоты), которые стимулируют сокращение ГМК в стенке сосуда, а также агрегацию тромбоцитов. Эти же гормоны стимулируют образование в эндотелиальных клетках простациклина (простогландин I_2) и оксида азота (NO), которые вызывают расслабление ГМК и препятствуют агрегации тромбоцитов. Таким образом, в результате секреторной активности эндотелия могут произойти либо сужение сосуда и усиление тромбоза (если секреция тромбксана и эндотелина превышает секрецию простациклина и NO), либо расширение сосуда и ослабление тромбоза (если секреция тромбксана и эндотелина окажется слабее, чем секреция простациклина и NO).

Спектр гормонов и уровень их секреции эндотелием зависит от эндокринных сигналов, которые действуют на эндотелиальную клетку, а также от функционального состояния эндотелия. Для регуляции давления и скорости протекания крови по сосудам чрезвычайно важно то, что эндокринный ответ эндотелия зависит также от механических сигналов, поступающих на клетки монослоя. Когда скорость протекания крови по сосудам повышается, это вызывает напряжение сдвига мембраны эндотелиальной клетки, в результате чего она вырабатывает NO,



Рис. 3.5. Регуляция гормонами клеток сосуда и крови.

расширяющий сосуд. Данная рефлексорная реакция позволяет немедленно открывать так называемые коллатерали (сосудистые шунты), когда по какой-то причине перекрывается кровоток по основной магистрали.

При высоком АД происходит растяжение сосуда, которое также воспринимается клетками сосудистой стенки. В ответ на это в них повышается синтез белков, секретируются гормоны, факторы роста и коллаген, усиливается также деление клеток. Все эти процессы происходят за счет возбуждения так называемых рецепторов растяжения. Хроническое действие этого стимула (например, вследствие артериальной гипертензии) может приводить к существенному сужению просвета сосуда и гипертрофии сердца.

Таким образом, эндотелий, выстилающий внутреннюю поверхность кровеносного сосуда, может воспринимать многочисленные гормональные и механические сигналы, интегрировать все эти воздействия и отвечать на них секрецией собственных гормонов, которые регулируют активность близлежащих ГМК. Эти клетки в свою очередь могут не только сокращаться и расслабляться, определяя тем самым величину кровяного давления, но также секретируют гормоны и факторы роста, которые вли-

яют на функциональное состояние снабжаемых кровью органов, а также клеток крови и эндотелия.

Очевидно, что механизм эстафетной передачи регуляторного сигнала в кровеносном сосуде очень похож на гипоталамо-гипофизарный путь проведения сигнала от ЦНС на эндокринные железы. Подобная эстафетная передача регуляторного сигнала от одного типа клеток к другому функционирует также в печени, мышцах, почках, желудке и других органах.

Механическое воздействие испытывают практически все ткани нашего организма. Так, например, при растяжении клеток мышечной и костной ткани стимулируется ее рост, активируется синтез специфических белков, увеличивается объем межклеточного пространства, т.е. происходит гипертрофия ткани. Растяжение легких при каждом вдохе воздуха вызывает секрецию эпителиоцитами специальных поверхностно-активных веществ, защищающих клетки альвеол от повреждения воздухом и взвешенными в нем частицами, а также предотвращающих схлопывание альвеол. Механическое растяжение любой ткани нашего организма приводит к активации тех самых внутриклеточных процессов, которые опосредуют действие гормонов и других биологически активных веществ (повышению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, фосфорилированию белков и т.п.), в результате чего стимулируется рост и дифференцировка клеток, синтез белков, секреция гормонов, простагландинов и факторов роста. Подобным образом осуществляется взаимосвязь между системами нейроэндокринной регуляции и механорецепции в нашем организме.

3.3. РЕГУЛЯЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ И РАСПАДА ГОРМОНОВ

В поддержании упорядоченности, согласованности всех физиологических и метаболических процессов у человека участвует более 100 гормонов и нейромедиаторов. Их химическая природа разная — это белки, полипептиды, пептиды, некоторые аминокислоты, производные аминокислот, стероиды, производные жирных кислот, некоторые нуклеотиды, эфиры и т.д. Естественно,

что у каждого класса этих веществ пути образования и распада разные. Рассмотрим основные принципы регуляции этого метаболизма.

3.3.1. БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Эти гормоны, как правило, образуются путем процессинга белковых предшественников. Такие белки-предшественники называются прогормонами. Однако обычно сначала синтезируются препрогормоны, из которых образуются прогормоны, а затем уже сами белковые гормоны.

Синтез белковых предшественников гормонов осуществляется на мембранах шероховатого ретикулума эндокринной клетки. Синтез внутриклеточных белков также происходит на этих мембранах, а завершается отщеплением образовавшейся полипептидной цепи в цитоплазму. В случае же секреторных белков образовавшаяся полипептидная цепь должна проникнуть через мембрану во внутренние полости ретикулума. Синтез белка начинается с N-конца, а у многих секретируемых белков первые 20–25 аминокислотных остатков на N-конце являются одинаковыми. Как только произошел синтез этого сигнального пептида, рибосома вместе с мРНК и синтезирующимся белком прикрепляется к мембране ретикулума, поскольку на мембране есть структуры, узнающие и связывающие эту последовательность, общую для секретируемых белков. Эта общая для секретируемых белков сигнальная последовательность состоит из гидрофобных аминокислотных остатков, поэтому она внедряется в мембрану и по мере синтеза пептидной цепи проникает через мембрану во внутреннее пространство ретикулума. После терминации синтеза препрогормон оказывается внутри ретикулума, после чего от него отщепляется «лишний» N-фрагмент, построенный из 20–25 аминокислотных остатков, и препрогормон становится прогормоном.

Превращение прогормона в гормон осуществляется в мембранах, формирующих аппарат Гольджи. Для того чтобы белковый гормон попал в эти мембраны, эндоплазматический ретикулум формирует специальные везикулы, которые затем отшнуровываются от него и попадают в цитоплазму. Везикулы с прогормоном

движутся в цитоплазме за счет энергозависимых процессов, в которых участвуют микротрубочки и микрофиламенты. Попадая на мембраны аппарата Гольджи, эти везикулы сливаются с ними, а прогормон оказывается внутри полостей, окруженных мембранами аппарата Гольджи. Там специфическая протеаза отщепляет от прогормона «лишние» фрагменты. Образующиеся при этом молекулы гормона окружаются мембраной аппарата Гольджи и в виде специальных везикул транспортируются к плазматической мембране. Внутри этих везикул, как правило, содержатся специальные белки и кофакторы, что приводит по мере транспорта этих везикул к их созреванию. Внутри этих везикул завершается модификация молекулы гормона (например, ацетилирование N-конца белка или амидирование его C-конца). После слияния зрелых везикул, содержащих молекулы гормона, с плазматической мембраной происходят их разрыв и выброс гормона и опустошенные везикулы вновь поступают в цитоплазму эндокринной клетки.

Такая последовательность событий установлена для целого ряда белково-пептидных гормонов. Проиллюстрируем ее на примере синтеза и процессинга молекулы инсулина.

Препроинсулин человека, образующийся в результате синтеза на шероховатом ретикулуме β -островков Лангерганса поджелудочной железы, представляет собой одну полипептидную цепь, состоящую из 109 аминокислотных остатков. После завершения синтеза этот пептид оказывается внутри ретикулума. Там от его N-конца отщепляется гидрофобный фрагмент, состоящий из 23 аминокислотных остатков. В молекуле проинсулина все сульфгидрильные группы замкнуты правильно, т. е. так же, как и в молекуле инсулина. Везикулы с проинсулином переносятся в аппарат Гольджи, и там мембранная протеиназа выщепляет из молекулы проинсулина (1–86) фрагмент 31–65. В результате этого образуется инсулин — 2 цепи А и В, соединенные между собой S–S-мостиками. Везикулы, которые формирует аппарат Гольджи, захватывают инсулин, выщепленный пептид (31–65), часть проинсулина (около 5% от количества инсулина), Zn^{2+} (эти ионы с высоким сродством присоединяются к инсулину, изменяют его пространственную структуру и препятствуют растворению). После присоединения инсулиновых гранул к плазматическим

мембранам в межклеточное пространство высвобождается весь секрет везикул.

Синтез молекулы проинсулина происходит за 1–2 мин. Транспорт проинсулина от эндоплазматического ретикулума до аппарата Гольджи занимает 10–20 мин. Созревание везикул, несущих инсулин от аппарата Гольджи до плазматической мембраны, протекает в течение 1–2 ч. При действии на β -клетки глюкозы стимулируется главным образом слияние инсулиновых везикул с плазматическими мембранами, что приводит к усиленной секреции, а скорости синтеза, процессинга и внутриклеточного транспорта инсулина практически не изменяются.

От начала синтеза белково-пептидных гормонов до момента появления их в местах секреции проходит 1–3 ч. Регуляция уровня этих гормонов в крови реализуется не путем изменения скорости синтеза или внутриклеточного транспорта, а путем активации или ингибирования их секреции. Большое количество этих гормонов запасено в секреторных гранулах. Регуляторный сигнал, поступающий в эндокринную железу, вызывает опустошение части этих гранул, в результате чего концентрация гормона в крови может быстро и значительно повышаться.

Концентрация белково-пептидных гормонов в крови обычно составляет 10^{-10} – 10^{-11} М. При стимуляции эндокринной железы концентрация соответствующего гормона возрастает в 2–5 раз. Так, например, в состоянии покоя в крови человека содержится около 0,2 мкг АКТГ (в расчете на 5 л крови), а при стрессе это количество возрастает до 0,8–1,0 мкг. В нормальных условиях в крови содержится 0,15 мкг глюкагона и 5 мкг инсулина. Когда человек голоден, содержание глюкагона может повышаться до 1 мкг, а содержание инсулина — снижаться на 40–60%. После сытного обеда концентрация глюкагона в крови в 1,5–2,8 раза снижается, а содержание инсулина повышается до 10–25 мкг.

Полупериод жизни белково-пептидных гормонов в крови составляет 10–20 мин. Они разрушаются протеиназами клеток-мишеней, крови, печени, почек. Возможна инактивация гормона и в самой эндокринной железе.

Помимо протеиназ, инактивировать гормоны могут и другие ферменты, модифицирующие структуру белковой или пептид-

ной молекулы. Так, например, нативная молекула инсулина не подвергается протеолизу. Первым этапом в инактивации инсулина является действие трансдегидрогеназы, которая катализирует реакцию восстановления сульфгидридных групп в молекуле инсулина. Свободные цепи инсулина становятся доступными для протеолиза и разрушаются инсулиназой, протеиназой, расположенной на мембранах клеток-мишеней и обладающей специфичностью и высоким сродством к инсулину.

3.3.2. СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Эти гормоны являются производными циклопентанпергидрофенантрена. Образуются из холестерина в коре надпочечников (кортикостероиды), а также в семенниках и яичниках (половые стероиды). Минорные количества половых стероидов могут образовываться в коре надпочечников, а кортикостероидов — в гонадах. Тип стероидного гормона, который образуется в той или иной ткани, определяется соотношением активности ферментов, катализирующих альтернативные пути его синтеза.

Большая часть холестерина, который используется для синтеза стероидных гормонов, поступает в эндокринные клетки из плазмы, где он связан преимущественно с ЛПНП. Около 30–40% холестерина, потребляемого на синтез гормонов, — это эндогенный холестерин, который образуется в эндокринных клетках и запасается в липидных каплях (рис. 3.6). И эндогенный, и экзогенный холестерин находятся в этерифицированной форме в виде эфиров с ненасыщенными жирными кислотами, поэтому первым этапом синтеза стероидных гормонов является отщепление жирной кислоты. Эту реакцию катализируют холестеринэстеразы.

Свободный холестерин поступает в митохондрии и там превращается в прегненолон. В этом превращении участвуют цитохром P₄₅₀ (оксидаза со смешанным типом действия), десмолаза и другие ферменты. Лимитирующей стадией синтеза прегненолона является гидроксилирование боковой цепи холестерина. Характерно, что прегненолон оказывает ингибирующее влияние на этот процесс.

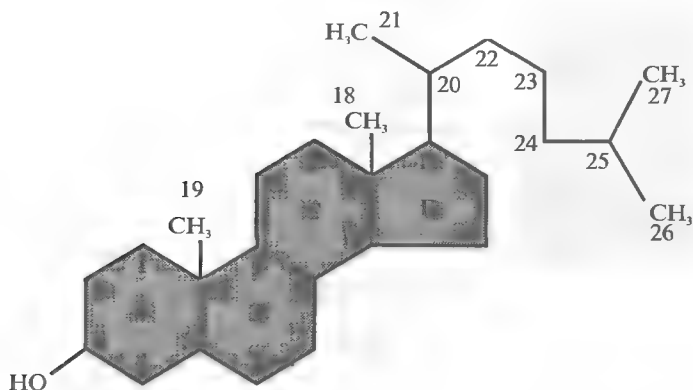


Рис. 3.6. Структурная формула холестерина.

Образовавшийся прегненолон покидает митохондрии и попадает в эндоплазматический ретикулум. Все дальнейшие реакции образования стероидных гормонов протекают на мембранах ретикулума или в цитоплазме.

В коре надпочечников синтез стероидных гормонов стимулируется АКТГ, а в половых железах — лютеинизирующим гормоном (ЛГ) (рис. 3.7). Эти гормоны активируют транспорт эфиров холестерина, а также расщепление эфирной связи. Оба тропных гормона ускоряют также гидроксирование ациклической части молекулы холестерина и ее последующее отщепление, т. е. активируют митохондриальные ферменты, участвующие в образовании прегненолона. Кроме того, тропные гормоны активируют процессы окисления сахаров и жирных кислот в эндокринных клетках, что обеспечивает процессы стероидогенеза энергией и пластическим материалом. Так, например, АКТГ стимулирует фосфоорилазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, изоцитратдегидрогеназу и малатдегидрогеназу. В результате этого в коре надпочечников накапливается НАДФН, необходимый для гидроксирования стероидов.

Молекулярные механизмы действия АКТГ и ЛГ на синтез стероидных гормонов связаны с образованием цАМФ и последующими реакциями цАМФ-зависимого фосфорилирования. С помощью этого механизма стимулируется транспорт холестерина,

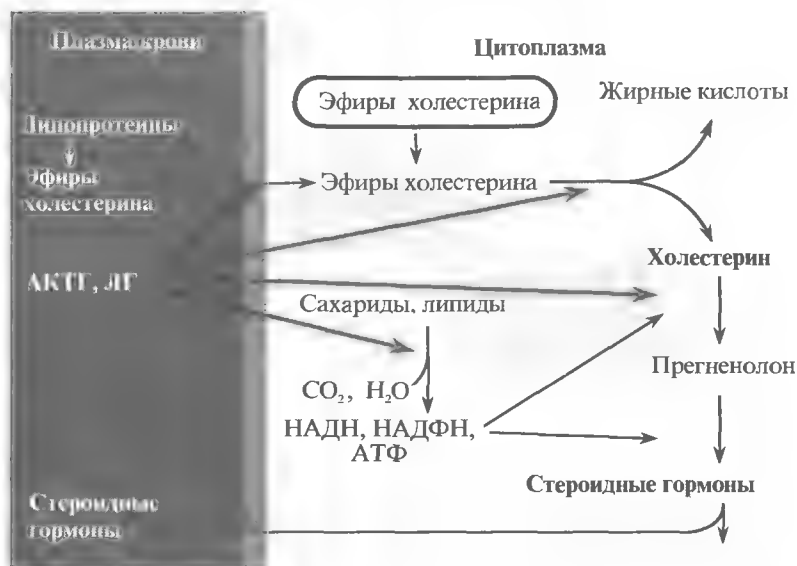


Рис. 3.7. Регуляция и компартментализация в клетке процессов биосинтеза стероидных гормонов.

активируются эстераза эфиров холестерина, триглицеридлипаза и фосфоорилаза.

В надпочечниках образуется около 30 стероидов. Бóльшая часть из них, по-видимому, является прогормонами. Так, например, дезоксикортикостерон оказывает то же действие, что и альдостерон, но он в 25–30 раз менее активен.

Кортикостероиды — это C_{21} -стероиды, имеющие в кольце А двойную связь, ОН-группу в положении 21 и 2 кетогруппы (положения 3 и 20) (рис. 3.8). Они подразделяются на 2 группы. Глюкокортикоиды (типичный представитель — кортизол) индуцируют синтез ферментов глюконеогенеза в печени, препятствуют поглощению глюкозы мышцами и жировыми клетками, а также способствуют высвобождению из мышц молочной кислоты и аминокислот, тем самым ускоряя также глюконеогенез в печени. Минералокортикоиды (типичный представитель — альдостерон) задерживают Na^+ в крови. Снижение концентрации Na^+ в секретах слюнных и потовых желез, а также в первичной моче приводит к меньшим потерям воды, так как вода движется через

биологические мембраны в направлении высокой концентрации солей. В результате этого минералокортикоиды повышают кровяное давление.

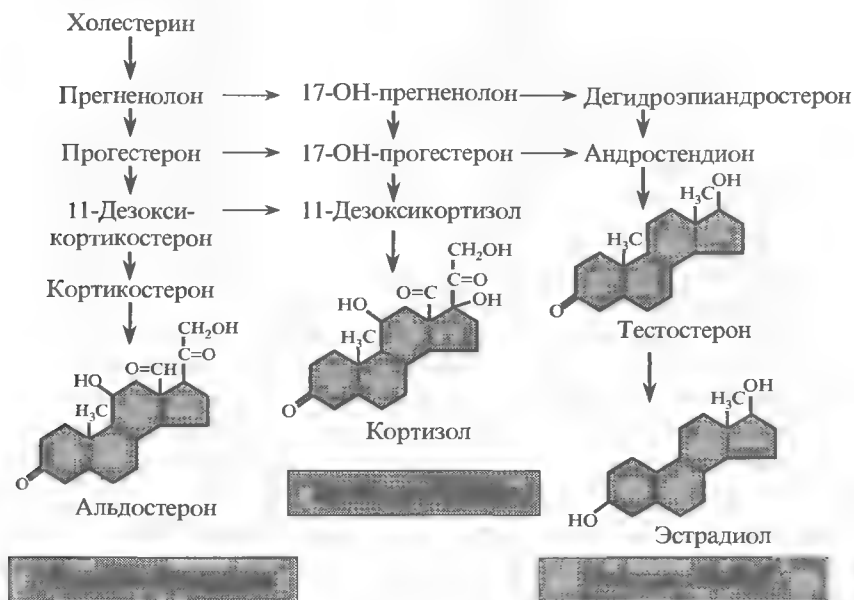


Рис. 3.8. Основные пути биосинтеза минералокортикоидов, глюкокортикоидов и половых гормонов в коре надпочечников.

Стимуляция синтеза глюкокортикоидов осуществляется через систему гипоталамус–гипофиз–надпочечники. Факторы стресса (эмоциональное возбуждение, боль, холод и т.п.), тироксин, адреналин и инсулин стимулируют секрецию кортиколиберина из аксонов гипоталамуса, этот гормон связывается с мембранными рецепторами аденогипофиза и вызывает секрецию АКТГ. Кортикотропин с током крови попадает в надпочечники и, связываясь там с мембранными рецепторами, стимулирует образование глюкокортикоидов и гормонов, вызывающих перераспределение энергетических ресурсов между тканями и повышающих устойчивость организма к неблагоприятным воздействиям.

На синтез минералокортикоидов АКТГ влияет слабо. Синтез минералокортикоидов имеет дополнительный механизм регуля-

ции, осуществляющийся через так называемую ренин-ангиотензинную систему. Анализаторы, реагирующие на давление крови, локализованы в афферентных артериолах почек. При снижении давления крови они вызывают секрецию ренина — специфической эндопротеазы с молекулярной массой 40 000 Д. Эта протеаза отщепляет от α_2 -глобулина крови С-концевой декапептид Асп-Арг-Вал-Тир-Иле-Гис-Про-Фен-Гис-Лей, который называют ангиотензин I. Затем от С-конца этого пептида ангиотензинпревращающий фермент, который локализован на наружной стороне эндотелиальных клеток, отщепляет 2 аминокислотных остатка и образуется октапептид ангиотензин II. Это гормон, который имеет специальные рецепторы на мембране клеток сосудов и коры надпочечников. Связываясь с этими рецепторами, ангиотензин II активирует фосфоинозитидный обмен и тем самым стимулируется вход Ca^{2+} в клетки. В результате этого активируется превращение кортикостерона или 11-дезоксикортикостерона в альдостерон. Образовавшийся альдостерон действует на дистальные каналы почек, потовые и слюнные железы, а также слизистую оболочку кишечника и увеличивает в них реабсорбцию Na^+ , Cl^- и HCO_3^- . При этом в крови повышается концентрация Na^+ и Cl^- и снижается концентрация K^+ . Эти эффекты альдостерона полностью блокируются ингибиторами синтеза белка. Отметим также, что, кроме ангиотензина II и АКТГ, синтез и секрецию альдостерона стимулируют также гормон роста и ионы K^+ в плазме крови.

Андрогены — мужские половые гормоны — являются C_{19} -стероидами, которые продуцируются интерстициальными клетками семенников и в меньших количествах яичниками и корой надпочечников. Основным андрогеном является тестостерон. Этот гормон может претерпевать изменения в клетке-мишени — превращаться в дигидротестостерон, который обладает большей активностью, чем тестостерон. Интересно, что ЛГ, который стимулирует начальные этапы биосинтеза стероидов в эндокринной железе, активирует также превращение тестостерона в дигидротестостерон в клетке-мишени, тем самым усиливая андрогенные эффекты.

Эстрогены, или женские половые гормоны, в организме человека в основном представлены эстрадиолом. Это C_{18} -стероиды

с ароматизированным А-кольцом и ОН-группой в положении 3. В клетках-мишенях они, по-видимому, не метаболизируют.

Действие андрогенов и эстрогенов направлено в основном на органы воспроизведения, проявление вторичных половых признаков, поведенческие реакции. Андрогенам свойственны также метаболические эффекты — усиление синтеза белка в мышцах, печени и почках. Эстрогены оказывают катаболическое влияние на скелетные мышцы, но стимулируют синтез белка в сердце и печени. Половые гормоны могут влиять на активность ключевых ферментов редупликации ДНК, поэтому им свойственны митогенные эффекты. Основные эффекты половых гормонов опосредуются процессами индукции и репрессии синтеза белка.

Стероидные гормоны влияют на общую нейроэндокринную регуляцию в организме. Поскольку рецепторы стероидов есть во многих отделах мозга, изменение уровня этих гормонов в крови сказывается на функции ЦНС, работе гипоталамо-гипофизарной системы (например, глюкокортикоиды тормозят секрецию тироксина, действуя на гипоталамус). Эстрогены индуцируют образование рецепторов прогестина в эпителиальных клетках, рецепторов окситоцина в матке. Глюкокортикоиды усиливают чувствительность жировых клеток и сердца к катехоламинам (пермиссивный эффект).

Как уже отмечалось, мембрана эндокринной клетки не чинит препятствия стероидным гормонам, поэтому их секреция происходит параллельно с синтезом. Содержание стероидов в крови определяется соотношением скоростей их синтеза и распада. Регуляция этого содержания осуществляется главным образом путем изменения скорости синтеза. Тропные гормоны (АКТГ, ЛГ) и ангиотензин стимулируют этот синтез. Устранение тропного влияния приводит к торможению синтеза гормонов.

В крови человека около 500 мкг кортизола. При стрессе его содержание повышается до 2000 мкг. Альдостерона в 1000 раз меньше — около 0,5 мкг. Если человек находится на бессолевой диете, содержание альдостерона повышается до 2 мкг. У мужчин содержание тестостерона (20–40 мкг) больше, чем у женщин (2–4 мкг). Содержание же эстрадиола у женщин (0,25–2,5 мкг, при беременности 50–100 мкг) большее, чем у мужчин (0,1–0,2 мкг). Следует отметить, что 90–95% стероидных гормонов

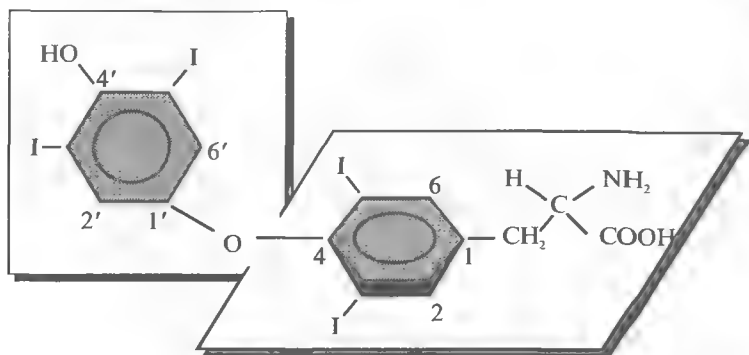
в крови обычно находится в связанном состоянии с белками плазмы. Действующие концентрации стероидных гормонов 10^{-8} – 10^{-10} М. Полупериод их жизни в крови человека равен 0,5–1,5 ч.

Распад стероидных гормонов может происходить во многих тканях: печени, почках, кишечнике, мышцах и др. Инактивация начинается с восстановления двойной связи в кольце А и гидроксирования. У эстрогенов, имеющих ароматическое А-кольцо, восстановления двойных связей не происходит. Гормон инактивируется путем гидроксирования и метоксилирования. Все эти модификации не только лишают молекулу биологической активности, но и повышают ее гидрофильность. Это имеет важное значение для экскреции метаболитов почками. Дальнейшее присоединение к инактивированным гормонам сульфата, фосфата, глюкуроновой кислоты и глутатиона делает молекулы еще более гидрофильными и тем самым ускоряет их удаление из организма.

3.3.3. ТИРЕОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Синтез этих гормонов протекает в щитовидной железе, для которой характерно высокое содержание ионов йода. Йодид химически инертен, окисление его в щитовидной железе происходит при участии пероксидазы. Образующийся йодиниум — ион I^+ — присоединяется к фенольному кольцу тирозила или к имидазольному кольцу гистидила, входящих в состав белков. В щитовидной железе йодируется главным образом тиреоглобулин — тетрамерный белок, имеющий молекулярную массу 660 000 Д и содержащий около 120 тирозилов. Йодирование тирозиловых остатков происходит при участии H_2O_2 и завершается образованием монойодтирозилов и дийодтирозилов. После этого происходит внутримолекулярная перегруппировка — сшивка 2 йодированных тирозилов. Эта окислительная реакция также протекает с участием пероксидазы и завершается образованием в составе тиреоглобулина трийодтиронина и тироксина. Для того чтобы эти гормоны освободились из связи с белком, должен произойти протеолиз тиреоглобулина. При расщеплении одной молекулы этого белка, построенной более чем из 5000 аминокислот и 300 углеводов, образуется всего 2–5 молекул тироксина

(Т₄) (рис. 3.9) и трийодтирони́на (Т₃). Т₄ и Т₃ секретируются в кровь в молярном соотношении, соответственно равном 4 : 1.



Тироксин (Т₄)

Рис. 3.9. Структурная формула тироксина.

Синтез и секреция тиреоидных гормонов находятся под контролем гипоталамо-гипофизарной системы. Тиролиберин, секретируемый гипоталамусом, связывается с рецепторами аденогипофиза и вызывает секрецию тиреотропного гормона — белка с молекулярной массой 28 000 Д, построенного из 2 субъединиц и содержащего 22 остатка цистеина. Как и у других секретируемых белков, у тиреотропного гормона все SH-группы окислены — они образуют 11 S-S-мостиков, стабилизирующих молекулу белка. Тиреотропный гормон активирует аденилатциклазу щитовидной железы, и именно этим, по-видимому, объясняется его стимулирующее действие на синтез и секрецию Т₃ и Т₄. Адреналин и простагландин Е₂ также могут повышать концентрацию цАМФ в щитовидной железе, при этом они вызывают такие же эффекты, как и тиротропин.

Активный транспорт ионов йода в железу происходит против 500-кратного градиента. Он ускоряется путем цАМФ-зависимого фосфорилирования клеточных мембран щитовидной железы. Под действием тиреотропина стимулируется также синтез рибосомальной РНК и мРНК тиреоглобулина, т. е. происходит усиление как транскрипции, так и трансляции белка, служащего источни-

ком тирозинов для синтеза T_3 и T_4 . Тиреотропин стимулирует также рост эпителиальных клеток щитовидной железы. Эти клетки формируют фолликул, в полости которого (бесклеточная среда, заполненная коллоидом, основной частью которого является тиреоглобулин) происходит йодирование тирозилов.

Секреция T_3 и T_4 идет путем пиноцитоза. При этом на апикальной стороне эндотелиальных клеток происходит захват частичек коллоида (вместе с йодированным тиреоглобулином). Эти частички окружаются мембраной эпителиальной клетки и поступают в цитоплазму в виде пиноцитозных пузырьков. При слиянии пузырьков с лизосомами эпителиальной клетки тиреоглобулин расщепляется, а T_3 и T_4 через базальную мембрану секретируются в кровь и лимфу. Вместе с T_3 и T_4 могут секретироваться моно- и дийодтирозины. Они быстро дейодируются и вновь поступают в фолликул.

Тиреотропный гормон и другие факторы, повышающие концентрацию цАМФ в щитовидной железе, стимулируют пиноцитоз коллоида, процесс образования и движения пиноцитозных пузырьков. Таким образом, тиреотропин ускоряет не только биосинтез, но и секрецию T_3 и T_4 .

При повышении в крови концентрации T_3 и T_4 подавляется секреция тиреолиберина и тиреотропного гормона. Кроме того, тиреотропные гормоны повышают в плазме крови концентрацию протеиназ, расщепляющих тиролиберин.

Ретроингибирование, наблюдающееся в процессах биосинтеза тиреоидных гормонов, может сказываться и на других гормональных системах организма, так как тиреолиберин стимулирует секрецию не только тиреотропного гормона, но и гормона роста, а кроме того, вызывает так называемые поведенческие эффекты. Обратная связь в биосинтезе тиреоидных гормонов может замыкаться также за счет того, что T_4 тормозит синтез тиреоглобулина.

Тиреоидные гормоны являются долгожителями среди всех гормонов и нейромедиаторов. Они могут циркулировать в крови в неизменном виде в течение нескольких дней. Такая устойчивость гормонов объясняется, по-видимому, образованием прочной связи с T_4 -связывающими глобулинами и преальбуминами в плазме крови. Эти белки имеют в 10–100 раз большее сродство

к T_4 , чем к T_3 , поэтому в крови человека содержится 300–500 мкг T_4 и лишь 6–12 мкг T_3 .

Инактивация тиреоидных гормонов. Наиболее уязвимыми в молекулах T_3 и T_4 являются атомы йода в положениях 3' и 5'. Их отщепление приводит к потере биологической активности гормона. Дейодирование наружного кольца тироксина, частично происходящее в щитовидной железе, полностью завершается в печени и приводит к формированию T_3 . Внутреннее кольцо тироксина дейодируется преимущественно в печени и частично в щитовидной железе и почках; в результате образуется так называемый реверсивный (обратный) T_3 , имеющий незначительную физиологическую активность.

Тиронин и йодтиронин могут подвергаться также декарбоксилированию, дезаминированию и переаминированию. В печени и почках могут образовываться конъюгаты тиронина с глюкуроновой кислотой или сульфатом, после чего конъюгат экскретируется.

3.3.4. КАТЕХОЛАМИНЫ

Источником катехоламинов, как и тиреоидных гормонов, служит тирозин, однако в случае биосинтеза катехоламинов метаболизму подвергается свободная аминокислота, а не тирозин белка (рис. 3.10). Образование катехоламинов происходит через стадии окисления, декарбоксилирования и метилирования молекулы. Синтез катехоламинов происходит в аксонах нервных клеток, запасание — в специальных везикулах. Катехоламины, образующиеся в мозговом слое надпочечников, секретируются в кровь, а не в синаптическую щель, т.е. являются типичными гормонами.

Синтез катехоламинов в гипоталамусе заканчивается образованием и накоплением в везикулах дофамина. Адреналин и норадреналин образуются этими клетками в минорных количествах. Предполагается, что пролактостатином, т.е. гормоном гипоталамуса, подавляющим секрецию пролактина, является дофамин. Известны и другие структуры мозга (например, стриарная система), которые находятся под влиянием дофамина и нечувствительны, например, к адреналину.

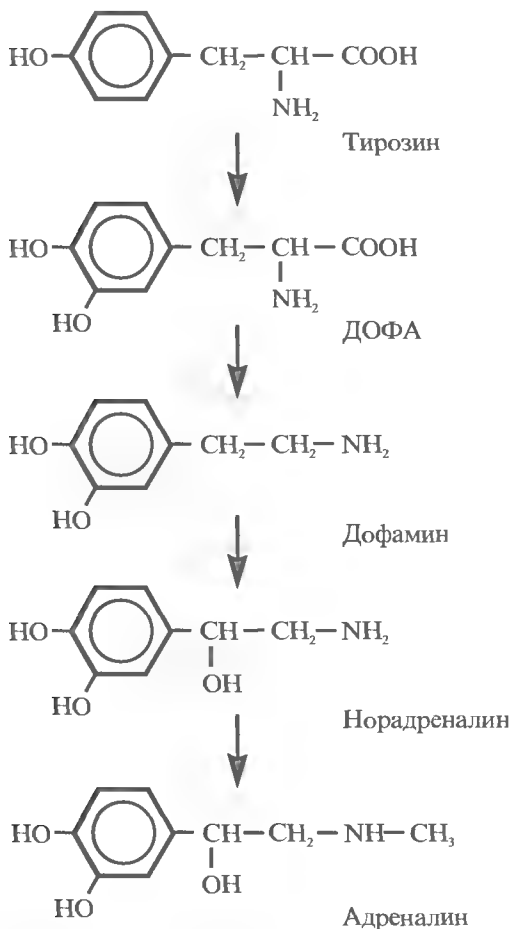


Рис. 3.10. Биосинтез катехоламинов в мозговом слое надпочечников. ДОФА — диоксифенилаланин.

В симпатических нервных волокнах дофамин не накапливается, а быстро превращается в норадреналин, который хранится в синаптических пузырьках. Адреналина в этих волокнах значительно меньше, чем норадреналина.

В мозговом слое надпочечников биосинтез завершается образованием адреналина. Норадреналина образуется в 4–6 раз меньше, а дофамин сохраняется лишь в следовых количествах.

Превращение тирозина в диоксифенилаланин (ДОФА), а затем в дофамин протекает в цитоплазме. Дофамин проникает в специальные везикулы, и если в них есть соответствующий фермент (дофамин- β -оксидаза) и кофакторы, то дофамин превращается в норадреналин. Норадреналин может секретироваться из этой везикулы во внеклеточное пространство или же выходить из нее в цитоплазму нервной клетки и там под действием метилазы превращаться в адреналин. Адреналин из цитоплазмы поступает в специальные везикулы на плазматической мембране, а затем из них секретируется.

В везикулах, запасających катехоламины, содержатся также специальный катехоламинсвязывающий белок и АТФ. Секреция сопровождается выбросом в кровь или в синаптическую щель как катехоламинов, так и АТФ и связывающего белка.

Синтез катехоламинов в мозговом слое надпочечников стимулируется нервными импульсами, поступающими по чревному нерву. Выделяющийся в синапсах ацетилхолин взаимодействует с холинергическими рецепторами никотинового типа и возбуждает нейросекреторную клетку надпочечника.

Наиболее медленной стадией в биосинтезе катехоламинов является первый этап — превращение тирозина в ДОФА. Эту реакцию катализирует тирозингидроксилаза — фермент, который активируется при холинергической стимуляции клетки. Благодаря существованию нервно-рефлекторных связей надпочечники отвечают усилением синтеза и секреции катехоламинов в ответ на болевые и эмоциональные раздражители, гипоксию, мышечную нагрузку, охлаждение и т. п. Существуют и гуморальные пути регуляции активности клеток мозгового вещества надпочечников. Синтез и секреция катехоламинов могут повышаться также под действием инсулина, глюкокортикоидов, при гипогликемии.

Катехоламины подавляют как собственный синтез, так и секрецию. Адреналин является мощным ингибитором метилазы, катализирующей превращение норадреналина в адреналин.

Активируя аденилатциклазу нейросекреторной клетки, катехоламины могут вызывать цАМФ-зависимое фосфорилирование тирозингидроксилазы, в результате чего активность начального фермента в процессе биосинтеза катехоламинов резко

снижается. В адренергических синапсах на пресинаптической мембране есть α -адренергические рецепторы. При выбросе катехоламинов в синапс эти рецепторы активируются и начинают оказывать ингибирующее влияние на секрецию катехоламинов. Аутоингибирование секреции свойственно, по-видимому, всем тканям, секретирующим эти гормоны или нейромедиаторы.

В отличие от холинергических синапсов, постсинаптическая мембрана которых содержит как рецепторы, так и ацетилхолинэстеразу, разрушающую ацетилхолин, в адренергических синапсах нет ферментов, разрушающих медиатор. Удаление из синапсов катехоламинов происходит путем обратного захвата медиатора нервным окончанием. Это активный транспорт, происходящий с большой скоростью и имеющий высокую избирательность. Поступающие в нервное окончание из синапса катехоламины вновь концентрируются в специальных везикулах и могут повторно участвовать в синаптической передаче.

Определенные количества катехоламинов могут диффундировать из синапсов в межклеточное пространство, а затем в кровь. Поэтому содержание норадреналина в крови может быть большим, чем содержание адреналина, несмотря на то что мозговое вещество надпочечников секретирует в кровь адреналин, а норадреналин секретируется в синапсах. Суммарное содержание катехоламинов в крови человека равно 1,5–2,5 мкг. При стрессе оно повышается в 4–8 раз. Период полужизни катехоламинов в крови равен 1–3 мин.

Гематоэнцефалический барьер не пропускает катехоламины из крови в мозг. В то же время ДОФА — предшественник катехоламинов — легко проникает через этот барьер и может усилить образование катехоламинов в мозге.

Инактивация катехоламинов. Катехоламины могут инактивироваться в тканях-мишенях, а также в печени и почках. Решающее значение в этом процессе играют два фермента — моноаминоксидаза, расположенная на мембране митохондрий, и цитозольный фермент катехол-О-метилтрансфераза. Моноаминоксидаза вызывает окислительное дезаминирование не только катехоламинов, но и гистамина, тирамина, серотонина и др. Катехол-О-метилтрансфераза катализирует оксиметилирование катехольного кольца. После этого катехоламины утративают

биологическую активность и экскретируются. Минорные количества катехоламинов экскретируются в виде сульфопроизводных и глюкуронидов.

3.3.5. ПРОСТАГЛАНДИНЫ

Простагландины образуются из ненасыщенных жирных кислот. Количество ненасыщенных связей в молекуле простагландинов обозначают цифрой, стоящей справа внизу от названия: ПГ₁, ПГ₂, ПГ₃. Их подразделяют также на группы: А — ненасыщенные кетоны, Е — оксикетоны, F — 1,3-диолы.

Биосинтез простагландинов начинается с отщепления арахидоновой кислоты от мембранного фосфолипида или диацилглицерина. Эту реакцию катализирует фосфолипаза А₂, липаза моноацилглицерина или липаза триглицеридов.

Циклооксигеназа при участии O₂ преобразует арахидоновую кислоту в эндоперекись, из которой образуется целое семейство простагландинов (рис. 3.11).

Эндоперекиси, образующиеся в процессе биосинтеза простагландинов, обладают высокой биологической активностью в опытах *in vitro*, но едва ли влияют на клетки *in vivo*, так как очень неустойчивы — период их полужизни равен менее 1 с. Простагландин-синтетазный комплекс представляет собой полиферментную систему, функционирующую на мембранах эндоплазматического ретикулума. Образующиеся простагландины проникают в плазматическую мембрану клетки. Они могут выходить из клетки и через межклеточное пространство переноситься на соседние клетки или проникать в кровь и лимфу.

Лимитирующим этапом в биосинтезе простагландинов является высвобождение арахидоновой кислоты, которое происходит при повышении в цитоплазме клетки ионов Ca²⁺ или цАМФ. Благодаря этому все гормоны и нейромедиаторы, активирующие аденилатциклазу или повышающие концентрацию Ca²⁺ в клетке, могут стимулировать синтез простагландинов. Другой причиной образования простагландинов под действием многих гормонов и факторов роста является то, что эти биологически активные вещества стимулируют образование диацилглицерина — источника арахидоновой кислоты.

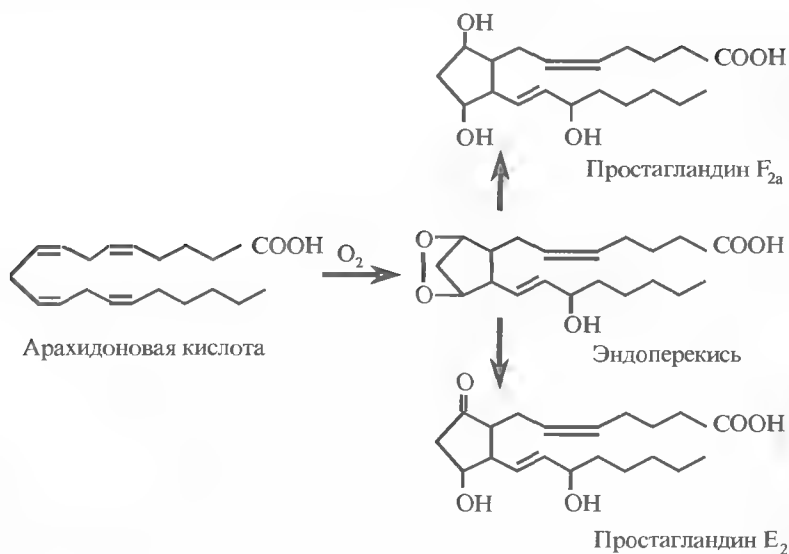


Рис. 3.11. Основные пути образования простагландинов из арахидоновой кислоты.

В семенниках и яичниках, где синтез простагландинов наиболее интенсивен, используется арахидоновая кислота, отщепляемая не только от фосфолипидов, но и от этерифицированного холестерина. В этих тканях лютеинизирующий гормон путем повышения концентрации цАМФ стимулирует холестеринэстеразу и холестеринацилтрансферазу, в результате чего образуются свободный холестерин, поступающий в стероидогенез, и арахидоновая кислота — источник простагландинов.

Простагландины группы Е могут активировать аденилатциклазу, а F — увеличивать проницаемость мембран для Ca^{2+} . Поскольку цАМФ и Ca^{2+} стимулируют синтез простагландинов, замыкается положительная обратная связь в синтезе этих специфических регуляторов.

Во многих тканях кортизол тормозит высвобождение арахидоновой кислоты, тем самым подавляя образование простагландинов. Именно этим принято объяснять противовоспалительное действие глюкокортикоидов. Простагландин E₁ является мощным пирогеном. Подавлением синтеза этого простагландина объяс-

няют терапевтическое действие аспирина, который ингибирует циклооксигеназу, вызывая ее ацетилирование.

Период полужизни простагландинов составляет 1–20 с. У человека и большинства млекопитающих основной путь инактивации простагландинов — это окисление 15-гидроксигруппы до соответствующего кетона. Данную реакцию катализирует 15-гидрокси-простагландин-дегидрогеназа — фермент, который есть практически во всех тканях, но в наибольшем количестве содержится в легких. Окисление ОН-группы в положении 15 приводит к инактивации молекулы, поэтому кровь, прошедшая через легкие, полностью лишена биологически активных простагландинов.

Дальнейшая деградация простагландинов происходит путем восстановления двойной связи (в положении 13–14), β -окисления COOH -конца и ω -окисления CH_3 -конца молекулы. После этого образуется 16-углеродная дикарбоновая кислота, которая выводится из организма.

3.4. СЕКРЕЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ

Благодаря своей липофильности стероидные гормоны не накапливаются в эндокринных клетках, а легко проходят через мембрану и поступают в кровь и лимфу. Поэтому регуляция содержания этих гормонов в крови осуществляется путем изменения скорости их биосинтеза.

Тиреоидные гормоны также липофильны и также легко проходят через мембрану, однако они ковалентно связаны в эндокринной железе с тиреоглобулином, поэтому могут секретироваться только после нарушения этой связи. Чем больше йодированных тиронилов в составе тиреоглобулина и чем выше скорость протеолиза йодированного белка, тем больше будет тиреоидных гормонов в крови. Регуляция содержания тиреоидных гормонов осуществляется двумя путями — ускорением как процессов йодирования, так и разрушения тироглобулина.

Гормоны, имеющие белковую и пептидную природу, а также катехоламины, гистамин, серотонин и т. п. — это гидрофильные

вещества, которые не могут диффундировать через мембрану. Для секреции этих молекул созданы специальные механизмы, чаще всего пространственно и функционально разобщенные с процессами биосинтеза.

Многие белково-пептидные гормоны образуются из предшественников большей молекулярной массы, и секреция этих гормонов становится возможной только после того, как произойдет отщепление «лишнего» фрагмента. Так, секреции инсулина предшествует превращение в β -клетках препроинсулина в проинсулин, а затем в инсулин. Существование прогормонов защищает эндокринную железу от местного действия гормона, а также обеспечивает его внутриклеточный транспорт. По мере превращения препрогормона в гормон обычно возрастает гидрофильность молекулы.

Последовательная модификация белка приводит к тому, что из эндоплазматического ретикулума он переходит в цистерны аппарата Гольджи, а затем в специальные везикулы на плазматической мембране. В везикулах завершается синтез молекулы гормона, мембрана везикулы защищает гормон от инактивации, но главный выигрыш, который дает такой способ запасаения гормона, — это возможность одновременного выброса в кровь большого количества регулятора. Биосинтез некоторых белково-пептидных гормонов, а также их транспорт к периферии секреторной клетки занимает обычно 1–3 ч. Очевидно, что воздействие на биосинтез приведет к изменению уровня гормона в крови лишь через несколько часов. Влияние же различных факторов на секрецию этих гормонов, синтезированных впрок и запасенных в специальных везикулах, позволяет повышать их концентрацию в несколько раз за секунды или минуты. В случае нейромедиаторов (норадреналин, дофамин, глутаминовая кислота, γ -аминомасляная кислота, глицин и нейропептиды) влияние тех же факторов на их секрецию позволяет осуществляться физиологическому эффекту этих регуляторов спустя доли миллисекунды или несколько миллисекунд.

Нейромедиаторы, вызывающие появление потенциала действия на клетке, синтезируются в нервных окончаниях и накапливаются в везикулах, окруженных мембраной. Везикула может передвигаться в нервном окончании. Попадая в участок выброса

медиатора, везикула разрывается и ее содержимое изливается в синаптическую щель. Нейромедиатор диффундирует через эту щель, связывается с рецептором на постсинаптической мембране, а активированный рецептор вызывает ток ионов через мембрану. Содержимое одного синаптического пузырька мало (несколько тысяч молекул медиатора).

Такое количество нейромедиатора может активировать лишь малую долю синаптических рецепторов. Поэтому разрыв одной везикулы приводит к изменению мембранного потенциала на величину порядка 0,5 мВ. Это изменение заряда называют миниатюрным потенциалом. Он не распространяется далее синапса и не приводит к каким-либо физиологическим эффектам, хотя играет важную роль в поддержании синаптических структур в состоянии готовности к восприятию и проведению возбуждающего сигнала. Частота возникновения миниатюрных потенциалов (в среднем один раз в секунду) полностью определяется частотой разрыва синаптических везикул.

Нейромедиаторы выделяются квантами по несколько тысяч молекул. Нервный импульс не изменяет величину квантов медиатора, но повышает частоту их выделения. Когда возбуждающий потенциал приходит в нервное окончание, за 1 мс в синапс изливается содержимое 200–400 везикул. Следовательно, при возбуждении частота миниатюрных потенциалов возрастает в 200 000–400 000 раз. При этом в тысячи раз большее число молекул нейромедиатора достигает постсинаптической мембраны, поэтому все (или почти все) рецепторы переходят в активированное состояние. Открывается большое число каналов для входа в клетку Na^+ или выхода из клетки K^+ и Cl^- , в результате чего на постсинаптической мембране либо возникает потенциал действия, либо развивается гиперполяризация. Так химическим путем осуществляется передача электрического заряда с нервной клетки на иннервируемую. Решающее значение в этом, как и в других секреторных процессах, играет Ca^{2+} . Появление потенциала действия на нервном окончании приводит к входу Ca^{2+} в аксоплазму, в результате чего стимулируется секретия нейромедиатора. Зависимость выброса медиатора от концентрации Ca^{2+} — кооперативный процесс с коэффициентом Хилла, равным 3–4.

Вместе с гормоном или нейромедиатором из везикулы выбрасываются и другие вещества, которые могут влиять на проведение регуляторного сигнала. В случае секреции катехоламинов это специальные связывающие белки, АТФ и РНК, в случае инсулина — ионы Zn^{2+} . Опустошенные везикулы не разрушаются. Они реконструируются и вновь возвращаются к месту синтеза гормона.

Ионы Ca^{2+} необходимы и для секреции гормонов гипофиза. Известно также, что в отсутствие Ca^{2+} не происходит выброса нейромедиаторов (ацетилхолина и норадреналина) из нервных окончаний. Устранение Na^+ и K^+ из перфузируемых растворов мало влияет на секреторную активность эндокринных и экзокринных желез, а устранение Ca^{2+} полностью блокирует их функции. Следовательно, для секреции гормонов и нейромедиаторов важна не собственно деполяризация мембраны, а происходящий при ней вход Ca^{2+} в цитоплазму клетки.

Поступив в кровь, гормоны связываются с транспортными белками. Это название, закрепившееся за специфическими белками крови, нельзя понимать буквально. Белки крови связывают молекулы гормона, тем самым защищая их от разрушения и экскреции. В связанной форме гормон с током крови переносится от места секреции к клеткам-мишеням. В этих клетках есть рецепторы, которые имеют большее сродство к гормону, чем белки крови. Однако, находясь в комплексе с белками крови, гормон не может взаимодействовать с рецептором.

Связывание с белками крови приводит к забуфериванию гормонов. Лишь свободные молекулы гормона могут взаимодействовать с рецептором. Однако как только они свяжутся с рецептором, равновесие в реакции взаимодействия гормона с транспортными белками сдвинется в сторону распада комплекса и концентрация свободных молекул гормона останется практически неизменной. При избытке гормонсвязывающих белков в крови концентрация свободных молекул гормона может снизиться до критической величины.

Связывание гормонов в крови зависит от их сродства к связывающим белкам и концентрации этих белков. У специфических гормонсвязывающих белков крови константа диссоциации для гормонов равна 10^{-7} – 10^{-9} М. К числу таких белков относятся

транскортин, связывающий кортикостероиды, тестостерон-эстрогенсвязывающий глобулин, тироксинсвязывающий глобулин, тироксинсвязывающий преальбумин и т. д. Едва ли не все гормоны могут связываться с альбумином, концентрация которого в крови в 1000 раз выше концентрации других гормонсвязывающих белков. Однако сродство к альбумину у гормонов в десятки тысяч раз ниже, поэтому с альбуминами обычно связано 5–10% гормонов, а со специфическими белками — 85–90%. Альдостерон, по-видимому, не имеет специфических транспортных белков, поэтому находится преимущественно в связи с альбумином. Лишь 0,5–5,0% молекул гормонов находится в крови в свободном состоянии. -

Концентрация гормонсвязывающих белков в крови может зависеть от функционального состояния организма, прежде всего от гуморальных факторов регуляции. Так, например, тиреоидные гормоны индуцируют образование тестостерон-эстрогенсвязывающего глобулина и транскортина.

На отклонение от нормы того или иного процесса жизнедеятельности первой реагирует нервная система регуляции. Нейромедиаторы, изменяя активность ионных каналов (являющихся одновременно рецепторами нейромедиаторов), вызывают гипер- или деполяризацию мембраны. Эта регуляция клеточной активности, происходящая за счет физических процессов (перемещение ионов через мембрану), развивается и гасится за доли секунд.

Если нервная система не в состоянии вернуть тот или иной фактор гомеостаза к норме, подключаются гормоны, действующие через мембранные рецепторы и системы вторичных посредников, которые стимулируют химическую модификацию белков. Наиболее хорошо изучено фосфорилирование, но известны также такие модификации белков, как миристилирование, АДФ-рибозилирование, гликозилирование и др., которые тоже могут находиться под контролем гормонов и изменять каталитическую активность, субклеточную локализацию или продолжительность жизни белков. Регуляция, происходящая за счет химических процессов (синтез и расщепление вторичного посредника, фосфорилирование и дефосфорилирование белка), развивается и гасится за минуты или десятки минут.

Если же отклонения от нормы того или иного процесса достигают опасных для организма величин или же должны произойти морфогенетические изменения организма, подключаются стероидные и тиреоидные гормоны, которые имеют цитозольные или ядерные рецепторы, что позволяет им взаимодействовать с хроматином и влиять на экспрессию генов. Эта регуляция, развивающаяся путем индукции или репрессии синтеза мРНК и белков, реализуется спустя 3–6 ч после появления гормона в крови, а гасится спустя 6–12 ч.

Промежуточное положение в этой иерархии занимают факторы роста, рецепторы которых являются тирозиновыми киназами. Взаимодействие фактора роста с рецептором приводит сначала к фосфорилированию определенных белков по ОН-группам тирозина, а затем к делению клеток. Следует отметить также, что многие нейромедиаторы (ацетилхолин, γ -аминомасляная кислота и др.), диффундируя из синаптической щели (которая всегда сообщается с межклеточным пространством) в кровь, приобретают свойства гормонов, вызывающих фосфорилирование белков.

3.5. НАРУШЕНИЯ ЭНДОКРИННЫХ ФУНКЦИЙ

Для нормального функционирования эндокринной системы ключевыми являются 3 звена: секреторная железа, рецептор для гормона на поверхности или внутри клетки-мишени и система обратной связи, позволяющая регулировать секрецию гормона в соответствии с эффективностью влияния этого гормона на ту или иную функцию в организме. Характерной особенностью патофизиологии эндокринной системы является то, что нарушение одного единственного регуляторного звена может приводить к развитию патологии в нескольких органах и тканях. Так, например, сахарный диабет, вызванный нехваткой инсулина в крови, приводит к сердечно-сосудистым заболеваниям, неврологическим и почечным осложнениям, ретинопатии и др.

Эндокринные заболевания могут возникать вследствие стресса, инфекций, плохого кровоснабжения желез, их воспалений или образования опухолей. В основе патогенеза часто лежит наследственный фактор, причем он может реализоваться как через гипотрофию или гипертрофию эндокринных желез, так и через

аутоиммунный процесс, а также через дефекты в структуре и нарушения экспрессии гормональных рецепторов, G-белков, протеинкиназ и т. п.

При дефектах эндокринной системы регуляции могут происходить генерализованные нарушения метаболизма и функциональной активности во многих клетках и тканях организма, в том числе в тех, которые не являются мишенями данных эндокринных факторов. Это объясняется прежде всего тем, что функция подавляющего большинства желез внутренней секреции находится под контролем гипоталамуса и гипофиза, которые воспринимают прямые и обратные связи соответственно от ЦНС и эндокринных желез. Кроме того, для эндокринной системы регуляции характерны перекрестное действие разных гормонов на одни и те же физиологические процессы, а также замыкание отрицательных обратных связей в процессах как секреции гормонов, так и внутриклеточного проведения их сигнала.

В целом, нарушения эндокринных функций могут проявляться как снижением активности эндокринных желез, так и ее повышением.

3.5.1. ГИПОТАЛАМУС И ГИПОФИЗ

Мозг воспринимает сигналы от всех тканей организма. Это происходит путем возбуждения афферентных (идущих к мозгу) нервных волокон, а также благодаря изменению состава или температуры крови, питающей мозг. Полагают, что все сигналы от органов чувств, а также соматических и висцеральных тканей, поступившие в мозг, анализируются в его высших отделах, после чего мозг направляет распорядительные нервные стимулы в гипоталамус (см. рис. 3.2).

Гормоны гипофиза можно подразделить на 3 группы: гормон роста и пролактин; гликопротеиновые гормоны — тиреотропный, лютеинизирующий и ФСГ; АКТГ, эндорфины, энкефалины и родственные им пептиды.

Гормон роста вскоре после рождения человека и вплоть до 20–25 лет стимулирует рост костей, скелетных мышц и внутренних органов. В течение всей жизни человека этот гормон стимулирует клетки иммунной системы. Пролактин вызывает

формирование молочных желез и образование в них молока, стимулирует родительский инстинкт. По механизму своего действия оба эти гормона относятся к цитокинам, так как действуют на клетку через типичные цитокиновые рецепторы, стимулирующие тирозиновое фосфорилирование белков.

Тиреотропный, лютеинизирующий и ФСГ имеют сложную четвертичную структуру. Они состоят из α -субъединиц, которые одинаковы у всех 3 гормонов, и β -субъединиц, которые у них разные. Влияют гормоны на свои ткани-мишени путем активации в них синтеза цАМФ. Тиреотропный гормон действует на щитовидную железу и стимулирует в ней образование и секрецию тироксина и трийодтиронина. У женщин ФСГ стимулирует созревание фолликулов яичника и синтез в них эстрогенов, а у мужчин усиливает сперматогенез. Другой гонадотропин, лютеинизирующий гормон, стимулирует образование андрогенов в семенниках и яичниках.

Третья группа гормонов (АКТГ, эндорфины, энкефалины и родственные им пептиды) представлена короткими пептидами, способными связываться с рецепторами, которые через G-белки стимулируют фосфоинозитидный обмен, а также K^+ -каналы и Ca^{2+} -каналы в тканях-мишенях. АКТГ взаимодействует с рецепторами в корковом слое надпочечников, вызывая синтез кортизола. Эта регуляция крайне важна для выживания человека в условиях стресса.

Нарушения в гипоталамо-гипофизарной системе могут проявляться как снижением функциональной активности гипофиза (гипопитуитаризм), так и ее повышением (гиперпитуитаризм).

Гипопитуитаризм

Гипопитуитаризм — недостаточность функций гипофиза или гипоталамуса с уменьшением или прекращением продукции одного или нескольких тропных гормонов передней доли. Достаточно редко наблюдается снижение уровня всех гипофизарных гормонов (пангипопитуитаризм, болезнь Симмондса). В случае медленно прогрессирующей деструкции ткани гипофиза сначала формируется недостаточность гормона роста и гонадотропинов, а затем развивается недостаточность тиреотропного гормона,

АКТГ и пролактина. В целом симптомы определяются снижением функции щитовидной железы, надпочечников и гонад. У детей отмечают задержку физического и полового развития.

Гиперпитуитаризм

Гиперпитуитаризм — расстройство функции аденогипофиза, характеризующееся повышением его гормональной активности (как правило, гормонально-активные аденомы гипофиза). В подавляющем числе случаев гиперфункция гипофиза выражается в повышенной секреции только одного из тропинов.

- Подавляющее большинство аденом гипофиза — пролактиномы (в гипофизе 15% женщин присутствуют бессимптомные микропролактиномы), секретирующие повышенное количество пролактина (при этом уровень пролактина в сыворотке превышает 20 нг/мл). У женщин пролактинома проявляется аменореей, галактореей и бесплодием (синдром галактореи-аменореи) вследствие ингибирования повышенным уровнем пролактина подъема секреции ЛГ, необходимого для овуляции. У мужчин пролактинома проявляется галактореей, гинекомастией, снижением либидо и импотенцией вследствие низкого уровня тестостерона. Дети, страдающие пролактиномой, характеризуются задержкой полового развития. 50% таких больных страдают ожирением.

- Гиперфункция клеток, которые секретируют гормон роста, приводит к гигантизму (до завершения остеогенеза) и акромегалии (по завершении окостенения эпифизарных хрящей). Обычно это является следствием потери чувствительности к ингибирующему действию соматостатина и не связано с нарушением действия соматолиберина. Уровень соматотропного гормона в крови повышается также при стрессе, голодании и почечной недостаточности.

- Гиперфункция клеток, секретирующих АКТГ (с последующей гиперсекрецией кортикостероидов), обычно проявляется болезнью Кушинга. Для этой патологии характерны гиперпигментация кожных покровов (эффект АКТГ), а также симптомы гиперкортицизма (уменьшение костной и мышечной массы, стрии красно-фиолетового цвета вследствие атрофии кожных покровов, ожирение, артериальная гипертензия, гипергликемия с разви-

тием стероидного диабета, гипокалиемия, а также подавление специфического иммунитета с развитием вторичного дефицита) и гиперандрогении, проявляющиеся снижением гонадотропной функции гипофиза и развитием половых расстройств (аменорея, бесплодие, гирсутизм, акне).

- Образование АКТГ повышено также у больных с адреногенитальным синдромом (врожденный дефект ферментов, участвующих в синтезе кортикостероидов), а также при некоторых формах первичного гиперальдостеронизма и гипертонии. Эти нарушения в синтезе АКТГ являются вторичными, т.е. опосредованы ослаблением действия стероидных гормонов на гипофиз.

- Реже всего отмечают гонадотропные и тиреотропные аденомы. Гонадотропные аденомы (как правило, макроаденомы, т.е. аденомы размером более 1 см) с повышением секреции ФСГ и ЛГ проявляются головными болями, нарушением зрения и приобретенным гипогонадизмом. Наиболее часто их отмечают у мужчин средних лет. Поскольку ЛГ в норме стимулирует продукцию тестостерона яичками, гипогонадизм у мужчин с гонадотропными аденомами кажется парадоксальным. Этот факт обычно объясняют секрецией ЛГ с неадекватной биологической активностью или нарушением самого характера секреции (в норме пульсирующего). Тиреотропные аденомы (повышение секреции тиреотропного гормона) проявляются симптомами гипертиреоза, зобом и очаговой симптоматикой.

Оценка функции

Клинико-биохимическая лабораторная диагностика, как правило, используется, если имеет место избыточная секреция гормонов гипофиза. Простые скрининговые тесты обычно дополняются более сложными динамическими исследованиями. Очень часто используется комбинированный тест исследования функции аденогипофиза. При выполнении теста отдельными шприцами вводят тиреолиберин, гонадолиберин и инсулин. Затем все гормоны определяют на 0, 30-й и 60-й минуте, а кортизол и гормон роста — дополнительно на 45-й, 90-й и 120-й минуте. При проведении теста врач должен обязательно запастись глюкозой и гидрокортизоном (для внутривенного введения). Тест опасен

в отношении развития инсулининдуцированной гипогликемии, поэтому часто инсулин заменяют соматолиберином и кортиколиберином.

Таким образом, для исследования гипофизарной функции используется комбинированный тиреолиберин-гонадолиберин-соматолиберин-кортиколиберин тест. С некоторыми модификациями этот же тест применим для оценки тиреоидной функции (тироксин) и функции гонад (тестостерон и эстрадиол).

Существующая в организме тесная взаимосвязь между гипоталамо-гипофизарной системой и надпочечниками позволяет оценивать функциональные возможности этой системы по уровню кортизола в сыворотке и моче. Ниже приведены особенности некоторых клинико-биохимических подходов, позволяющих оценивать активность гипоталамо-гипофизарной системы с точки зрения ее связи с корой надпочечников.

КОРТИЗОЛ СЫВОРОТКИ

Измерение уровня кортизола в сыворотке чаще всего проводят радиоиммунологическими методами. Необходимо учитывать, что назначение преднизолона и преднизона пациентам может существенно искажать результаты таких исследований. Время сбора образцов крови для анализов должно быть строго регламентировано, так как для секреции гормона характерны циркадные ритмы с максимумом в 8.00–9.00 и минимумом в 22.00–24.00. Стресс во время взятия крови может повысить уровень кортизола. Интересно, что при синдроме Иценко–Кушинга циркадный ритм секреции кортизола нарушается.

КОРТИЗОЛ МОЧИ

После того как кортизол метаболизировался в печени, его метаболиты, в том числе 17-оксикетостероиды, выводятся с мочой. Лишь небольшое количество неизмененного кортизола выводится с мочой. Уровень выведения кортизола с мочой связан с уровнем свободного кортизола в сыворотке и скоростью адреналовой секреции. Измерение кортизола в 24-часовом сборе мочи является чувствительным тестом избыточной секреции этого гормона. Вместе с тем тест малоинформативен при дифференциации нормальной и сниженной секреции.

УРОВЕНЬ АКТГ В ПЛАЗМЕ

Исследование уровня АКТГ в плазме имеет важное значение и для оценки функции надпочечников. Повышение уровня гормона наблюдается при болезни Аддисона как следствие нарушения регуляторного влияния гормонов надпочечников на гипофиз. Снижение уровня АКТГ наблюдается при надпочечниковой недостаточности, связанной с нарушением гипоталамо-гипофизарной функции. Уровень АКТГ также снижается при синдроме Иценко–Кушинга, если последний вызван опухолью надпочечников или приемом экзогенных стероидов.

АЛЬДОСТЕРОН

Определение уровня альдостерона проводится при подозрении на первичный гиперальдостеронизм. В связи с тем что на секрецию альдостерона влияет положение человека, это исследование проводят либо утром после сна, либо после перехода человека из горизонтального положения в вертикальное. Исследование проводится при следующих условиях: диуретическая и антигипертензивная терапия прекращается за 4–6 нед до анализа; строго контролируется прием натрия; параллельно с уровнем альдостерона измеряется концентрация ренина.

СТЕРОИДЫ В МОЧЕ

С этой целью используются хроматографические методы, преимущественно газожидкостная хроматография, которые позволяют одновременно определять большое число стероидов и их метаболитов. С помощью таких методов удастся достаточно точно оценить экскрецию гормонов.

ДИНАМИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ

Чувствительность и информативность многих методов определения гормонов в биологических жидкостях зачастую ограничены. Это связано со сложностями в определении небольших функциональных отклонений работы эндокринных желез и многофакторном влиянии на гормональный статус. Для преодоления этих ограничений в клинической практике используют динамические тесты, преимуществом которых является возможность непосредственно определить причину заболевания. К таковым

относятся дексаметазонсупрессорный, инсулинотолерантный гипогликемический и АКТГ-стимулирующий тесты.

Дексаметазонсупрессорный тест. Дексаметазон, синтетический аналог кортизола, используется для подавления продукции АКТГ гипофизом. Суть теста заключается в дробном введении дексаметазона при контроле за уровнем кортизола в сыворотке и моче. Ложноположительные результаты крайне редки. Этот тест используется для дифференциальной диагностики гипоталамозависимого синдрома Иценко–Кушинга, так как при опухолях надпочечников или эктопической продукции АКТГ угнетения секреции кортизола не происходит.

Инсулинотолерантный гипогликемический тест. Инсулин, вводимый внутривенно, приводит к развитию у пациента гипогликемии. Характер ответа на такой индуцированный стресс подтверждает или исключает диагноз синдрома Иценко–Кушинга. Тест также применяется для диагностики гипопитуитаризма. Нормальная реакция на введение инсулина свидетельствует об отсутствии нарушений гипоталамо-гипофизарно-адреналовой связи, исключает надпочечниковую недостаточность и нарушение гипоталамических резервов. Это исследование не очень удобно, поскольку связано с риском развития гипогликемии.

АКТГ-стимулирующий тест. Вводят синтетический аналог АКТГ, обладающий адекватной биологической активностью и меньшей аллергенностью, при одновременном мониторинговании уровня кортизола в крови. Данный тест позволяет проводить дифференциальную диагностику первичной адренокортикальной недостаточности (болезнь Аддисона).

3.5.2. ПОЛОВЫЕ ЖЕЛЕЗЫ

3.5.2.1. Женские половые железы

Яичники секретируют эстрадиол, андростендион и прогестерон. Фолликул яичника представляет собой яйцеклетку, окруженную плоскими эпителиальными клетками и соединительнотканной оболочкой. Изнутри эта капсула заполнена фолликулярной жидкостью и зернистыми (гранулярными) клетками. При синтезе эстрогенов гранулярные и эпителиальные клетки функ-

нистых клетках они превращаются в женские половые гормоны (эстрон и эстрадиол), очевидно, что для продукции женских половых стероидов должна осуществляться строгая согласованность синтеза и секреции гонадотропинов в гипофизе.

Образование в гипоталамусе гонадолиберина и стимуляция им секреции ФСГ и ЛГ служат основным сигналом для полового созревания. Время начала секреции и количества секретируемого гонадолиберина детерминировано генетически, однако на его секрецию влияют также нейромедиаторы ЦНС: норадреналин, дофамин, серотонин и эндорфины.

Обычно гонадолиберин выбрасывается из гипоталамуса короткими импульсами, между которыми наблюдается 2–3-часовая пауза. Спустя несколько минут после выброса гонадолиберина в крови появляются гонадотропины. Секреция гонадотропинов зависит также от уровня половых стероидов в крови: эстрогены подавляют выброс ФСГ и стимулируют секрецию ЛГ гипофизом, а прогестерон тормозит секрецию гонадолиберина в гипоталамусе. Таким образом замыкаются регуляторные связи между сигналами из центральной нервной системы и активностью яичников, осуществляющих стероидогенез.

Ключевую роль в циклическом функционировании женских половых желез играет ФСГ, секреция которого стимулируется гонадолиберинном и низким уровнем эстрогенов. ФСГ проводит селекцию только одного из фолликулов (доминантного), который вступает в менструальный цикл. После этого резко усиливается синтез эстрогенов, что вызывает (по механизму отрицательной обратной связи) снижение уровня ФСГ. Почти одновременно с этим наблюдается резкий подъем уровня ЛГ, который стимулирует созревание доминантного фолликула, его разрыв и выход яйцеклетки. Сразу же после этого снижается продукция эстрогенов, что приводит (по механизму отрицательной обратной связи) к подавлению секреции ЛГ. Наступает фаза созревания желтого тела, которая сопровождается перемещением яйцеклетки в матку. Это путешествие длится 8–9 дней, и, если не происходит оплодотворения яйцеклетки, желтое тело постепенно снижает продукцию эстрогенов и прогестерона, в результате чего наступает менструация. Если же оплодотворение все-таки происходит,

то желтое тело начинает играть важнейшую роль в прикреплении оплодотворенной яйцеклетки и образовании плаценты.

СНИЖЕНИЕ ФУНКЦИИ

Аменорея (отсутствие менструации) является самой частой причиной женского бесплодия. Сравнительно редко она имеет первичный характер, т. е. вызвана недоразвитостью половых органов, отсутствием желтого тела, гиперплазией надпочечников, сниженной функцией гипофиза или щитовидной железы. В подавляющем большинстве случаев аменорею вызывают стресс, значительное снижение массы тела, тяжелые физические упражнения, хронические заболевания. Все эти факторы влияют на секрецию гонадолиберина гипоталамусом, вследствие чего нарушается согласованность в образовании гонадотропинов, а следовательно, изменяются синтез стероидных гормонов и функциональное состояние яичников и матки.

Интересен механизм развития аменореи при инсулиннезависимой форме гиперинсулинемии. При высокой концентрации инсулин способен не только связываться со своим рецептором, но и активировать рецептор инсулиноподобного фактора роста, что приводит к синтезу андрогенов в оболочке фолликулов.

Причиной аменореи может быть также избыточная продукция гипофизом пролактина, что приводит к нарушению частоты секреции гонадолиберина гипоталамусом. Иногда аменорею вызывают болезнь Кушинга и акромегалия.

ПОВЫШЕНИЕ ФУНКЦИИ

К гиперфункции яичников приводят синдром поликистоза яичников и гормонально-активные опухоли яичников (адренобластома, арренобластома и гранулезотектаклеточные опухоли).

- *Поликистоз яичников* характеризуется отсутствием овуляции, связанным с избытком андрогенов (преимущественно андростендиона) вследствие врожденной или приобретенной недостаточности ферментных систем, катализирующих превращение андрогенов в эстрогены, и ожирением. Синдром обнаруживается у 3–5% женщин репродуктивного возраста. В биохимической диагностике этого синдрома важное значение придают соотношению ЛГ и ФСГ (не менее 2 : 1).

• *Андробластома и арренобластома* — редкие опухоли мезенхимного происхождения, обычно обладающие андрогенной активностью. Проявления: дефеминизация, включающая атрофию молочных желез и матки с последующей маскулинизацией (гирсутизм, появление угрей, изменение линии оволосения, гипертрофия клитора и огрубение голоса).

• *Гранулезотеклоклеточные опухоли* возникают у женщин как до первой менструации, так и во время менопаузы и постменопаузы и характеризуются патологическими кровотечениями и преждевременным развитием молочных желез. Опухоли, секретирующие эстрогены, состоят из клеток гранулезы атрезирующего фолликула и клеток стромы яичников.

ОЦЕНКА ФУНКЦИИ

Гонадотропины сыворотки

В норме в сыворотке уровень гонадотропинов вариабелен, что обусловлено пульсаторным характером их секреции. Определение уровня ЛГ и ФСГ используется для оценки аменореи. Повышенный уровень наблюдается при первичной половой недостаточности, крайне низкий уровень — при гипоталамо-гипофизарных заболеваниях. Повышение соотношения ЛГ/ФСГ наблюдается при синдроме овариального поликистоза.

Эстрогены

Секреция эстрогенов носит циклический характер. В лаборатории клинической биохимии обычно определяют уровень 17β -эстрорадиола, по которому проводят мониторинг ановулярных женщин, страдающих ановуляцией, и пациенток, подлежащих экстракорпоральному оплодотворению.

Прогестерон

Определение концентрации прогестерона используют для визуализации овуляции, так как его уровень возрастает примерно в 4 раза после овуляции. Прогестерон является термогенным фактором, поэтому повышение температуры тела также свидетельствует о произошедшей овуляции.

Андрогены

Хотя и установлено, что гирсутизм и вирилизация вызываются повышением уровня андрогенов, часто бывает затруднительно

сразу определить, что является источником тестостерона — яичники, кора надпочечников или усиленная периферическая продукция. Об источнике тестостерона обычно судят по результатам измерения концентрации других андрогенов — андростендиона и дегидроэпиандростерона. Повышение концентрации последнего подтверждает, что источником гиперпродукции является кора надпочечников, а если в роли источника выступают яичники, то возрастает концентрация андростендиона.

3.5.2.2. Мужские половые железы

Тестостерон, естественный андроген, секретируется интерстициальными клетками яичек. Он необходим для нормального сперматогенеза, развития вторичных мужских половых признаков и роста мужских половых органов в пубертатном периоде.

Андрогены повышают анаболические процессы в организме и увеличивают количество белков, накапливающихся в тканях, особенно в мышечной. Ускоряется как рост костей, так и скорость закрытия эпифизов, что определяет низкорослость при преждевременной половозрелости или передозировке андрогенов в процессе лечения ребенка с гипогонадизмом.

Неадекватное влияние андрогенов во время эмбриогенеза приводит к развитию крипторхизма и микрофаллоса. Если нарушение функционирования клеток Лейдига происходит до пубертатного периода, то это приводит к задержке полового созревания, если оно происходит после полового созревания, то диагностика часто бывает крайне затруднительной.

ТЕСТИКУЛЯРНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ

Гипогонадизм у мужчин проявляется при недостаточном сперматогенезе в извитых семенных канальцах и нарушении синтеза тестостерона в клетках Лейдига. Дефекты сперматогенеза вызывают стерильность, тогда как дефицит тестостерона приводит к неадекватному развитию и поддержанию вторичных половых признаков.

Определение уровня гонадотропина, тестостерона и пролактина позволяет установить тип гипогонадизма (гипергонадотропный или гипогонадотропный). При этом не рекомендуют использовать определение 17-кортикостероидов в моче из-за низ-

кой информативности. Микроскопическое исследование эякулята позволяет прямо оценить репродуктивную функцию яичек и косвенно определить гормональный статус мужчины. По биопсии яичек судят о состоянии сперматогенеза.

ПОВЫШЕНИЕ ФУНКЦИИ

Повышение функциональной активности тестикул отмечают в период полового созревания у подростков, а в более старшем возрасте оно может быть вызвано опухолями или гиперплазией клеток Лейдига и надпочечников. Причины преждевременного полового созревания у мальчиков разделяют на гонадотропиннезависимые и гонадотропинзависимые синдромы.

ОЦЕНКА ФУНКЦИИ

Гонадотропины

У мужчин пульсаторные колебания ЛГ в крови более выражены, чем колебания ФСГ, поэтому пробы для анализа берут в одно и то же время, например около 9.00, чтобы минимизировать эти эффекты. Низкий уровень и гонадотропинов, и тестостерона может свидетельствовать о поражении гипоталамуса. Высокий уровень ЛГ при низком уровне тестостерона заставляет думать о первичном поражении семенников. Только повышение ФСГ обычно указывает на поражение зародышевого эпителия.

Тестостерон

У здорового мужчины пики секреции тестостерона происходят каждые 60–90 мин. Большая часть тестостерона связана с белками: 65% — с глобулинами, 30–33% — с альбумином крови. Физиологической активностью обладает свободная фракция тестостерона (2–5% от общего уровня).

Пролактин

Гиперпролактинемия у мужчин приводит к нарушению сперматогенеза.

Эстрогены

Повышение уровня эстрогенов у мужчин может наблюдаться при интенсивном синтезе при заболеваниях надпочечников или опухолях семенников; снижении скорости метаболизма эстрогенов при болезнях печени; при ожирении, когда происходит усиление ароматизации андрогенов.

Динамические тесты

В настоящее время динамические тесты при заболеваниях половых желез используются в основном для оценки пограничных состояний недостаточности секреции гормонов.

Кломифеновый тест. Кломифен, антиэстроген, препятствует отрицательному регуляторному влиянию на гипофиз, что приводит к повышению секреции ЛГ и ФСГ. В течение недели кломифен дают пациенту и проводят мониторинг уровней ЛГ и ФСГ. Недостаточность реакции может свидетельствовать в пользу гипоталамо-гипофизарного гипогонадизма.

Гонадолибериновый тест. Тест основан на мониторингировании уровня гонадотропинов в ответ на прием 100 мг гонадолиберина и позволяет дифференцировать гипофизарные и гипоталамические причины гипогонадизма. Повышение секреции гонадотропинов наблюдается при гипоталамических заболеваниях.

Тест стимуляции хорионическим гонадотропином. Хорионический гонадотропин человека стимулирует клетки Лейдига. Этот тест используют для оценки секреции тестостерона семенниками. При первичных поражениях семенников ответной реакции не наблюдается.

3.5.3. ЩИТОВИДНАЯ ЖЕЛЕЗА

Нарушения функции щитовидной железы приводят ко многим тяжелым заболеваниям, так как T_4 и T_3 , образующиеся в щитовидной железе под действием тиреотропного гормона, регулируют множество процессов в организме. T_3 и T_4 увеличивают скорость обменных процессов (ускоряют катаболизм белков, жиров и углеводов), необходимы для нормального развития ЦНС, увеличивают ЧСС и сердечный выброс (наиболее вероятно за счет повышения чувствительности рецепторов миокарда к катехоламинам и прямого токсического эффекта тироксина на миокард), влияют на водно-солевой обмен (подавляют продукцию антидиуретического гормона). Крайне разнообразные эффекты йодсодержащих гормонов на клетки-мишени (практически все клетки организма) объясняют увеличением синтеза белка и потребления кислорода.

Наиболее частая причина гипотиреоза у взрослых — болезнь Хашимото. Это аутоиммунное заболевание, при котором в крови появляется большое количество антител к белкам щитовидной железы. При этом подавляются синтез и секреция T_4 и T_3 , поэтому по принципу обратной связи усиливается секреция гипофизом тиреотропного гормона, который стимулирует гипертрофию щитовидной железы, в результате чего появляется зоб.

Клиническая картина гипотиреоза многолика (отдельно взятые симптомы неспецифичны) и определяется сниженным уровнем тиреоидных гормонов в крови в сочетании с компенсаторными реакциями со стороны других органов и систем. Поражительная амбивалентность симптомов (одинаково возможны как брадикардия, так и тахикардия, как аменорея, так и полименорея, как задержка полового созревания, так и преждевременное половое созревание и т.д.) делают порой диагностику первичного гипотиреоза достаточно трудной. У пожилых больных клиническая картина часто стертая, в этом случае диагностика может быть основана только на лабораторных критериях (прежде всего определяют уровень ТТГ как наиболее чувствительного показателя гипотиреоза). При первичном поражении щитовидной железы уровень ТТГ повышен, при вторичном (при поражении гипофиза), снижен.

К типичным клиническим проявлениям гипотиреоза относят снижение температуры тела (обычно ниже 36°C), непереносимость холода (больные постоянно мерзнут), сонливость и общую слабость. В большинстве случаев отмечают брадикардию, тенденцию к снижению АД, сухость кожных покровов и выпадение волос, одутловатость лица и характерные отеки (не оставляющие ямок при надавливании) вследствие накопления слизистого, богатого мукополисахаридами вещества в тканях. Последний феномен описывают термином «микседема», который иногда употребляют в качестве синонима тяжелого гипотиреоза.

Повышение функции

Гипертиреоз — физиологическое или патологическое повышение активности щитовидной железы (дефиниция, используемая в русской медицинской литературе). В англо- и немецкоязычной литературе термины «гипертиреоз» и «тиреотоксикоз» — синонимы.

Тиреотоксикоз — более широкий термин, означающий патологическое состояние, обусловленное чрезмерным количеством гормонов щитовидной железы в организме (не обязательно вследствие гиперфункции щитовидной железы) и характеризующееся повышением основного обмена, нарушениями функций нервной и сердечно-сосудистой систем. Возможны тиреотоксикоз без гипертиреоза (например, при передозировке препаратов тиреоидных гормонов) и гипертиреоз без тиреотоксикоза (например, при беременности).

Гипертиреоз никогда не наблюдается у новорожденных. Он очень редок у детей, но у взрослых отмечается значительно чаще, чем гипотиреоз. Одна из частых причин гипертиреоза — образование АТ, которые, связываясь с рецептором тиреотропного гормона на наружной поверхности плазматической мембраны клеток щитовидной железы, имитируют действие этого гормона — стимулируют аденилатциклазу, которая через систему цАМФ-зависимого фосфорилирования вызывает образование и секрецию T_4 и T_3 . В результате этого происходит также диффузное увеличение щитовидной железы.

Высокий уровень в крови тиреоидных гормонов вызывает повышенную возбудимость и потливость, непереносимость тепла или постоянное чувство жара, учащенное сердцебиение, увеличение пульсового АД (повышение систолического АД при снижении диастолического), тремор, высокую утомляемость, снижение массы тела, увеличение щитовидной железы, изменения со стороны глаз и расстройства в половой сфере (у женщин вплоть до аменореи, у мужчин отмечают снижение потенции). Многие из этих эффектов объясняют тем, что тиреоидные гормоны изменяют чувствительность тканей к катехоламинам. Они стимулируют экспрессию β -адренергических и подавляют экспрессию α -адренергических рецепторов. При гипертиреозе образование тиреотропного гормона резко снижается (по механизму отрицательной обратной связи).

Оценка функции

По традиции биохимические исследования в диагностике заболеваний щитовидной железы называют тестами тиреоидной функции, подразумевая при этом первоочередное определение

Тиреотоксикоз — более широкий термин, означающий патологическое состояние, обусловленное чрезмерным количеством гормонов щитовидной железы в организме (не обязательно вследствие гиперфункции щитовидной железы) и характеризующееся повышением основного обмена, нарушениями функций нервной и сердечно-сосудистой систем. Возможны тиреотоксикоз без гипертиреоза (например, при передозировке препаратов тиреоидных гормонов) и гипертиреоз без тиреотоксикоза (например, при беременности).

Гипертиреоз никогда не наблюдается у новорожденных. Он очень редок у детей, но у взрослых отмечается значительно чаще, чем гипотиреоз. Одна из частых причин гипертиреоза — образование АТ, которые, связываясь с рецептором тиреотропного гормона на наружной поверхности плазматической мембраны клеток щитовидной железы, имитируют действие этого гормона — стимулируют аденилатциклазу, которая через систему цАМФ-зависимого фосфорилирования вызывает образование и секрецию T_4 и T_3 . В результате этого происходит также диффузное увеличение щитовидной железы.

Высокий уровень в крови тиреоидных гормонов вызывает повышенную возбудимость и потливость, непереносимость тепла или постоянное чувство жара, учащенное сердцебиение, увеличение пульсового АД (повышение систолического АД при снижении диастолического), тремор, высокую утомляемость, снижение массы тела, увеличение щитовидной железы, изменения со стороны глаз и расстройства в половой сфере (у женщин вплоть до аменореи, у мужчин отмечают снижение потенции). Многие из этих эффектов объясняют тем, что тиреоидные гормоны изменяют чувствительность тканей к катехоламинам. Они стимулируют экспрессию β -адренергических и подавляют экспрессию α -адренергических рецепторов. При гипертиреозе образование тиреотропного гормона резко снижается (по механизму отрицательной обратной связи).

Оценка функции

По традиции биохимические исследования в диагностике за-

ТТГ, общего и свободного T_4 . Прежде чем остановиться на особенностях лабораторной оценки функции щитовидной железы, необходимо отметить, что часто у пациентов с тяжелыми тиреоидными заболеваниями, такими, как зоб или рак, в крови может определяться нормальная концентрация гормонов щитовидной железы.

ТИРЕОТРОПНЫЙ ГОРМОН

Уровень ТТГ в крови — чувствительный показатель поражения щитовидной железы, так как снижение синтеза и секреции тиреоидных гормонов по принципу отрицательной обратной связи тут же сказывается на этом параметре. Интенсивное развитие методов клинической биохимии привело к тому, что в настоящее время в арсенале диагноста-эндокринолога имеются сверхчувствительные методы определения ТТГ, способные определять крайне низкие уровни гормона и отличать их от нижних пределов референтных значений.

В общем случае повышение уровня ТТГ наблюдается при гипотиреозе и действии таких лекарственных препаратов, как амиодарон и литий. Напротив, снижение концентрации ТТГ отмечается при гипертиреозе, нарушении функции гипофиза, некоторых нетиреоидных заболеваниях. В некоторых странах определение уровня ТТГ в крови новорожденных используют как скрининговый тест в диагностике кретинизма, сочетая этот показатель с диагностикой фенилкетонурии. При кретинизме уровень ТТГ всегда высокий. Для точной диагностики определение уровня ТТГ всегда сочетают с параллельным измерением уровня T_4 .

ОБЩИЙ И СВОБОДНЫЙ ТИРОКСИН

В плазме большая часть T_4 (99,95%) транспортируется в виде комплексов со следующими белками: тироксинсвязывающим глобулином, альбумином и транстиреином (преальбумином). Вместе с тем в определении биологических эффектов гормонов решающую роль играют несвязанные, или свободные молекулы T_4 . Кроме того, показатель свободного T_4 всегда более информативен по сравнению с общим уровнем T_4 , поскольку менее зависим от уровня ТТГ.

ТРИЙОДИРОНИН

Данные об уровне T_3 часто необходимы для диагностики некоторых случаев гипертиреоза, когда уровень T_4 нормален. В диагностике гипотиреоза определение уровня T_3 имеет небольшое значение.

ТИРЕОЛИБЕРИНОВЫЙ ТЕСТ

Этот тест предполагает внутривенное введение тиреолиберина при мониторинговании ТТГ. Отмечаются отсутствие ответа при гипофизарном гипотиреозе и резкое усиление ответа при первичном гипотиреозе. Также наблюдается угнетение реакции при гипертиреозе за счет подавления гипофизарной секреции высоким уровнем циркулирующих тиреоидных гормонов.

3.5.4. НАДПОЧЕЧНИКИ

Кора надпочечников синтезирует стероидные гормоны (глюкокортикоиды, минералокортикоиды и андрогены), хромаффинная ткань мозговой части — катехоламины.

Кора надпочечников

Кора надпочечников — источник 3 важнейших классов гормонов: глюкокортикоидов, минералокортикоидов и половых гормонов (см. рис. 3.8). Нормальное функционирование пары надпочечников возможно только при секреции гипофизом АКТГ, стимулирующего главным образом синтез глюкокортикоидов (в меньшей степени половых стероидов и альдостерона).

Глюкокортикоиды. Основной представитель — кортизол, на его долю приходится 80% всех глюкокортикоидов в организме (остальные 20% — кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортизол и 11-дезоксикортикостерон).

Функции глюкокортикоидов разнообразны — от регуляции метаболизма до модификации иммунного и воспалительного ответов.

Углеводный обмен. Глюкокортикоиды стимулируют образование глюкозы в печени путем увеличения скорости глюконеогенеза (за счет стимуляции синтеза его ключевых ферментов) и освобождения аминокислот (субстратов глюконеогене-

за) в мышцах, а также стимуляции гликогенолиза. Поэтому глюкокортикоиды играют жизненно важную роль при стрессе, позволяя превращать почти все конечные продукты катаболизма в глюкозу, снабжающую энергией активно работающие ткани.

Липидный обмен. Липолиз усиливается в конечностях. Липогенез усиливается в других частях тела (туловище и лицо). Такая дифференцировка обменного процесса при синдроме Кушинга придает характерный внешний вид больным.

Белковый обмен. Глюкокортикоиды оказывают анаболическое действие в печени и катаболическое — в других органах.

Эндокринная система. Длительная терапия глюкокортикоидами приводит к подавлению секреции АКТГ, что в свою очередь при длительном применении (4–6 мес и более) ведет к атрофии коры надпочечников почти у половины больных (поэтому при отмене глюкокортикоидов после длительного применения появляются клинические и лабораторные признаки надпочечниковой недостаточности). Глюкокортикоиды при длительном использовании также подавляют секрецию ТТГ и гормона роста гипофизом и соматомединов печенью. Поэтому в детском возрасте применение глюкокортикоидов может приводить к задержке роста.

Иммунная система. В высоких дозах глюкокортикоиды выступают как иммунодепрессанты (их применяют для предупреждения отторжения трансплантированных органов, при *myasthenia gravis*): они подавляют пролиферацию В- и Т-лимфоцитов, вызванную Аг, что приводит к снижению уровня АТ при инфекциях.

Воспаление. Глюкокортикоиды имеют выраженный противовоспалительный эффект. Механизмы противовоспалительного действия многообразны. Определяющим звеном считают способность глюкокортикоидов увеличивать синтез липокортина и подавлять синтез коллагена (за счет подавления активности фибробластов). Кроме того, глюкокортикоиды подавляют синтез некоторых провоспалительных цитокинов (например, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α), стабилизируют лизосомальные мембраны, тормозят хемотаксическую и фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов. Поэтому у пациентов с синдромом Ку-

шинга даже минимальная травма, приводящая к поражению кожи, может вызвать тяжелое инфекционное воспаление.

Костно-мышечная система. Глюкокортикоиды при длительном применении ингибируют синтетическую активность остеобластов, в результате чего развивается остеопороз. В развитие остеопороза вносит вклад способность глюкокортикоидов повышать резорбцию кости и увеличивать экскрецию кальция почками (таким образом, глюкокортикоиды — антагонисты витамина D). Длительное применение глюкокортикоидов также поддерживает катаболизм мышц, что приводит к их атрофии и мышечной слабости.

Обмен калия и натрия. Большая часть глюкокортикоидов обладает минералокортикоидной активностью, что проявляется задержкой в организме натрия (с возможным развитием отеков и артериальной гипертензии) и потерей калия (см. гл. 1). Кортизон и гидрокортизон обладают выраженным минералокортикоидным эффектом. Синтетический глюкокортикоид преднизолон обладает преимущественно глюкокортикоидной активностью. Синтетические препараты глюкокортикоидов дексаметазон и бетаметазон обладают небольшим минералокортикоидным эффектом, поэтому широко применяются при необходимости подавления АКТГ (дексаметазоновые пробы). Угнетающий эффект этих стероидов на ось гипоталамус–гипофиз–надпочечники наиболее выражен при их назначении на ночь. Дексаметазон и бетаметазон также показаны в случаях, когда реабсорбция воды нежелательна (например, при лечении отека мозга).

Нервная система. Действие глюкокортикоидов на ЦНС неоднозначно. Связываясь со своими рецепторами в ЦНС, глюкокортикоиды вызывают изменения настроения, эйфорию или, наоборот, депрессию, различные психозы. Разнообразное действие на ЦНС может отмечаться как при избытке глюкокортикоидов, так и при их недостатке.

Кроветворная система. Глюкокортикоиды оказывают стимулирующее влияние на гранулоцитарный и эритроидный ростки гемопоэза, приводя к эритроцитозу и нейтрофилезу с относительной лимфопенией и эозинопенией.

Минералокортикоиды. Основной представитель — альдостерон. Суммарный вклад других кортикостероидов, обладающих минералокортикоидной активностью, мал (по сравнению с альдостероном). Главный регулятор синтеза и секреции альдостерона — ангиотензин II; в меньшей степени влияние на синтез и секрецию альдостерона оказывают АКТГ, натрийуретические факторы, концентрация ионов натрия и калия, а также простагландины.

Функция минералокортикоидов — поддержание баланса электролитов и жидкостей организма. Она осуществляется посредством влияния на реабсорбцию ионов в почечных канальцах при связывании с альдостероновыми рецепторами.

Na⁺. Альдостерон увеличивает реабсорбцию ионов натрия. Задержка натрия приводит к увеличению содержания воды в организме и повышению АД.

K⁺. Альдостерон увеличивает экскрецию ионов калия. Потеря калия вызывает гипокалиемию.

Cl⁻, HCO₃⁻, H⁺, Mg²⁺, Ca²⁺. Альдостерон увеличивает реабсорбцию хлора, бикарбоната и почечную экскрецию ионов водорода.

Андрогены. В коре надпочечников синтезируются дегидроэпиандростерон и в меньшей степени андростендион. Недостаточность ферментов стероидогенеза (11-, 17- и 21-гидроксилазы) приводит к изменениям наружных гениталий у плодов, нарушениям электролитного баланса и в зависимости от типа дефекта и пола плода к различным нарушениям полового созревания. Функция андрогенов надпочечников остается во многом неизученной; несомненны анаболический и гипохолестеринемический эффекты. У мужчин надпочечники играют незначительную роль в создании общей концентрации андрогенов в плазме.

Мозговая часть надпочечников

Мозговая часть надпочечников в отличие от коркового слоя регулируется не эндокринными механизмами, а прямыми нервными сигналами: по чревному нерву приходит возбуждающий импульс, в синапс выбрасывается ацетилхолин, который связывается с ацетилхолинергическими рецепторами никотинового

типа, в результате чего возникает потенциал действия на иннервируемых клетках. При этом на короткое время возрастает концентрация Ca^{2+} в цитоплазме, что служит сигналом как для секреции катехоламинов, так и для их дополнительного синтеза. Подобный тип регуляции эндокринной железы — исключение из обычного правила; его можно объяснить тем, что мозговая часть надпочечника в эмбриогенезе образуется из нервной ткани, поэтому у нее сохраняется типичный нейрональный тип регуляции. В мозговой части надпочечников образуется адреналин и в меньшем количестве норадреналин.

Катехоламины имеют широкий спектр эффектов (воздействие на гликогенолиз, липолиз, глюконеогенез, существенное влияние на ССС). Вазоконстрикция, сокращение миокарда и другие эффекты катехоламинов реализуются через α - и β -адренергические рецепторы на поверхности клеток-мишеней (ГМК, секреторные клетки, кардиомиоциты). Серьезные клинические проблемы возникают при опухолях эндокринных клеток и их предшественников (феохромоцитомы, нейробластома).

Дисфункция коры надпочечников

Как правило, гипофункция коры надпочечников сопровождается снижением секреции как глюкокортикоидов (обладающих минералокортикоидной активностью), так и собственно минералокортикоидов (альдостерона). В этом случае используют термин «гипокортицизм». Гиперфункцию коры надпочечников обозначают термином «гиперкортицизм». При изолированной пониженной секреции альдостерона используют термин «гипоальдостеронизм», при повышенной — «гиперальдостеронизм».

Гипокортицизм. Снижение продукции гормонов корой надпочечников может происходить в результате разрушения надпочечников различного генеза (первичная надпочечниковая недостаточность) или дисфункции гипоталамуса или гипофиза (вторичная надпочечниковая недостаточность).

Основа патогенеза — дефицит кортизола, приводящий к гиперпродукции АКТГ гипофизом (согласно принципу отрицательной обратной связи), что объясняет появление гиперпигментации. Прогрессирующий дефицит кортизола и альдостерона так-

же приводит к нарушениям углеводного, белкового, липидного и водно-солевого обмена. В частности, развивается гипонатриемическая дегидратация с гиперкалиемией, гиперкальциемией, гипохлоремией, гипогликемией и кетозом. Уменьшение объема циркулирующей крови приводит к нарастанию внутриклеточной дегидратации с развитием метаболического ацидоза, выраженной артериальной гипотензии (вплоть до коллапса), снижением сердечного выброса и клубочковой фильтрации (вплоть до анурии).

Гипофункция коры надпочечников приводит к повышению утомляемости, мышечной слабости, снижению массы тела, анорексии, гиперпигментации кожи и снижению АД. У мужчин, страдающих болезнью Аддисона (первичная надпочечниковая недостаточность, как правило, аутоиммунного генеза), снижается либидо, у женщин сохраняется способность к зачатию, а также к вынашиванию ребенка, так как гормоны, образующиеся в плаценте и у плода, защищают мать от стероидной недостаточности. У женщин также отмечают выпадение волос на лобке и в подмышечной области (вследствие уменьшения выработки андрогенов в надпочечниках). У мужчин подобной симптоматики не отмечают, поскольку большая часть андрогенов синтезируется в яичках. У детей отмечают заметное отставание в росте и предрасположенность к гипогликемическим состояниям.

Дефицит кортизола надпочечниками снижается также при туберкулезе почек и адреногенитальном синдроме.

Адреногенитальный синдром (врожденная дисфункция коры надпочечников) — аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное дисфункцией коры надпочечников вследствие нарушения выработки того или иного фермента стероидогенеза, обычно сопровождающееся чрезмерной секрецией андрогенов и признаками вирилизации. Дефицит кортизола уже внутриутробно стимулирует выработку АКТГ, что приводит к гиперплазии коры надпочечников и избыточной продукции АКТГ-зависимых стероидов, синтез которых при данной недостаточности фермента не нарушен (в основном надпочечниковых андрогенов — дегидроэпиандростерона, андростендиона). Наиболее известная форма

синдрома обусловлена частичной или полной недостаточностью 21-гидроксилазы.

Гиперкортицизм, обусловленный гиперпродукцией глюкокортикоидов корой надпочечников вследствие кортикостеромы (доброкачественной или злокачественной опухоли надпочечников) или синдрома эктопической продукции АКТГ (например, при мелкоклеточном раке легкого), называют синдромом Кушинга. Отдельно выделяют ятрогенный (лекарственный) синдром Кушинга, отмечаемый значительно чаще, чем спонтанный (обычно развивающийся у больных, длительное время получающих глюкокортикоиды по поводу бронхиальной астмы, ревматоидного артрита и других заболеваний). При гиперкортицизме, обусловленном аденомой гипофиза, говорят о болезни Кушинга (см. раздел «Гиперпитуитаризм»), при которой развивается гиперплазия обоих надпочечников. Дифференциально-диагностические критерии гиперкортицизма приведены в табл. 3.1.

Уровень кортизола в крови повышается не только при синдроме (болезни) Кушинга, но также при стрессе, болевом шоке, алкоголизме, беременности и гипотиреозе (так называемый функциональный гиперкортицизм).

Гипоальдостеронизм может быть изолированным, сочетаться с дефицитом других кортикостероидов (например, при болезни Аддисона или адреногенитальном синдроме) или вызываться снижением чувствительности рецепторов к действию альдостерона, синтез которого не нарушен (псевдогипоальдостеронизм). Различают первичный и вторичный гипоальдостеронизм. В обоих случаях недостаточность альдостерона приводит к снижению реабсорбции натрия и воды в почечных канальцах и повышению реабсорбции калия и хлора с развитием артериальной гипотензии и метаболического ацидоза.

- Первичный гипоальдостеронизм у грудных детей обусловлен недостаточностью 2 ферментных систем — 18-оксидазы и 18-гидроксилазы. Он может сочетаться с полигландулярным аутоиммунным синдромом I типа. Потеря натрия и артериальная гипотензия повышают продукцию ренина (гиперренинемический гипоальдостеронизм).

- Вторичный гипоальдостеронизм наблюдают у взрослых. Он связан с недостаточной продукцией ренина почками или

Таблица 3.1. Дифференциально-диагностические критерии гиперкортицизма

Показатели	Болезнь Кушинга	Кортикостерома	Синдром эктопической продукции АКТГ
Клинические проявления гиперкортицизма	Выражены	Выражены	Не выражены или выражены не полностью
Возраст больных, годы	20–40	20–50	50–70
Гиперпигментация	Встречается редко, слабо выражена	Отсутствует	Встречается часто, интенсивная
Уровень калия в плазме	В норме или понижен	В норме или понижен	Значительно снижен
Уровень АКТГ в плазме, пг/мл	До 200	Не определяется	> 200
Уровень кортизола в плазме (17-оксикетостероиды в моче)	Увеличен в 2–3 раза	Увеличен в 2–3 раза	Увеличен в 3–5 раз
Реакция на дексаметазон	Положительная	Отрицательная	Отрицательная

сниженной его активностью (гипоренинемический гипоальдостеронизм). Часто осложняет течение сахарного диабета и хронического нефрита с почечно-канальцевым ацидозом с поражением сосудов почек. Может возникать при длительном приеме определенных лекарственных препаратов (гепарин, нестероидные противовоспалительные препараты, β -адреноблокаторы и ингибиторы АПФ). Может развиваться после удаления альдостеромы одного из надпочечников в результате атрофии клубочковой зоны другого, при острой алкогольной интоксикации или болезни Аддисона.

- Псевдогипоальдостеронизм может быть наследуемым и приобретенным. Приобретенный псевдогипоальдостеронизм может развиваться вследствие поражения почек при системной красной волчанке и серповидноклеточной анемии, амилоидозе, интер-

стициальном нефрите, обструктивной нефропатии, применении триамтерена, амилорида или спиронолактона.

Гиперальдостеронизм может быть первичным и вторичным. Первичный гиперальдостеронизм развивается вследствие альдостеронпродуцирующей аденомы (синдром Конна) или гиперплазии надпочечников (идиопатический гиперальдостеронизм) и проявляется артериальной гипертензией, гипокалиемией и низким уровнем ренина в сыворотке крови. Вторичный гиперальдостеронизм (в отличие от первичного) обусловлен причинами, локализованными вне надпочечников (стеноз почечных артерий, злокачественная гипертензия, ренинсекретирующие опухоли, эктопические очаги секреции АКТГ, нефротический синдром, сердечная недостаточность, цирроз печени, кровотечения), при этом содержание ренина значительно повышено. Составляет большую часть случаев гиперальдостеронизма.

Дисфункция мозговой части надпочечников

Гиперфункция, проявляющаяся повышенной секрецией катехоламинов, наблюдается при стрессовых ситуациях, феохромоцитоме (опухоли мозговой части надпочечников), при хирургических вмешательствах, в острой фазе инфаркта миокарда, при артериальной гипертензии, длительной гиподинамией, тяжелой физической нагрузке, недостаточности коры надпочечников и почек, при курении и хроническом алкоголизме. Содержание норадреналина возрастает практически при всех тех нарушениях, которые вызывают рост уровня адреналина в крови, а также при эпилепсии в период приступов и при переохлаждении организма.

Клинически гиперфункция мозговой части надпочечников проявляется тахикардией, обильным потоотделением, тремором, головной болью, повышенным чувством тревоги. При феохромоцитоме ко всем этим симптомам присоединяется артериальная гипертензия. Поскольку адреналин подавляет секрецию инсулина, активирует гликогенолиз и липолиз, у больных с феохромоцитомой отмечают гипергликемию и глюкозурию, а также быстрое снижение массы тела.

Гипофункция. Сниженный уровень адреналина и норадреналина наблюдают при недоразвитии мозгового вещества надпочечников, олигофрении, депрессии, миопатиях и мигрени.

3.5.5. ПОДЖЕЛУДОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА

Эндокринная часть поджелудочной железы — совокупность островков Лангерганса (1–2% от всего объема железы). В островках различают несколько типов эндокринных клеток, синтезирующих и секретирующих в просвет капилляров инсулин (β -клетки), глюкагон (α -клетки), соматостатин (δ -клетки), панкреатический полипептид (PP-клетки) и у детей младшего возраста гастрин (G-клетки). Наиболее многочисленны (примерно 70%) синтезирующие инсулин β -клетки. β -Клетки составляют около 20% от общего количества островковых клеток, оставшаяся часть принадлежит δ -, PP- и G-клеткам. В клинической практике наиболее важны гормоны-антагонисты инсулин и глюкагон, участвующие в регуляции уровня глюкозы в крови.

Концентрация глюкозы в крови обычно составляет 3,3–6,05 ммоль/л. Если она повышается на 20–30% (вследствие приема пищи, богатой углеводами, или выброса в кровь больших количеств адреналина и глюкагона), происходит секреция инсулина.

Инсулин

Главные мишени инсулина — печень, скелетные мышцы, жировые клетки. Действие инсулина на мишени разнообразно (регуляция обмена углеводов, липидов и белков). Инсулин — гормон с анаболическим действием, а также главный регулятор гомеостаза глюкозы. Это единственный гормон, снижающий концентрацию глюкозы в крови. Инсулин стимулирует следующие процессы.

- Мембранный транспорт глюкозы, т. е. перенос глюкозы через клеточные мембраны в мышцах и жировой ткани с помощью специальных трансмембранных белков-переносчиков глюкозы. Стимуляция инсулином приводит к увеличению скорости поступления глюкозы внутрь клетки в 20–40 раз. В сердце, скелетных мышцах и жировой ткани инсулин стимулирует переносчик глю-

козы в плазматической мембране, а в печени этот гормон активирует гексокиназу и глюкокиназу, что также ускоряет проникновение углеводов в клетку. Параллельно с активацией транспорта глюкозы инсулин подавляет синтез ключевых ферментов глюконеогенеза (фосфоенолпируваткарбоксикиназы и фруктозо-1,6-дифосфатазы), снижает концентрацию цАМФ в печени, тем самым уменьшая активность фосфорилазы и триглицеридлипазы, но стимулируя гликогенсинтазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, продуцирующую НАДФН, кофермент синтеза жирных кислот и глицерофосфата (рис. 3.13). В результате этого в печени начинается активный синтез гликогена и ТГ — создается запас высококалорийных и легко мобилизуемых питательных веществ. Таким образом, инсулин ингибирует распад и активирует синтез гликогена, жиров и белков, т.е. оказывает действие, противоположное действию таких гормонов, как глюкагон, кортизол и адреналин.

- Гликолиз, т.е. ферментативный процесс расщепления глюкозы, протекающий без потребления кислорода, приводящий к образованию молочной кислоты и сопровождающийся образованием АТФ (гликолиз — основной источник энергии в анаэробных условиях, например в работающей скелетной мышце).

- Синтез АТФ, ДНК и РНК, что проявляется ускоренной пролиферацией клеток.

Рецептор инсулина обеспечивает реализацию эффектов инсулина на мишени. При взаимодействии инсулина со своим рецептором в цитоплазматической мембране происходит активация аденилатциклазы с образованием цАМФ, который при участии кальция и магния регулирует утилизацию глюкозы и синтез белка.

- Чувствительность и экспрессия инсулиновых рецепторов обратно пропорциональны уровню инсулина в крови, т.е. при снижении уровня циркулирующего инсулина (например, при инсулинзависимом сахарном диабете) увеличиваются экспрессия инсулиновых рецепторов и их чувствительность к гормону, а при повышении уровня циркулирующего инсулина (например, при инсулиннезависимом сахарном диабете) экспрессия инсулиновых рецепторов и их чувствительность к гормону снижены.

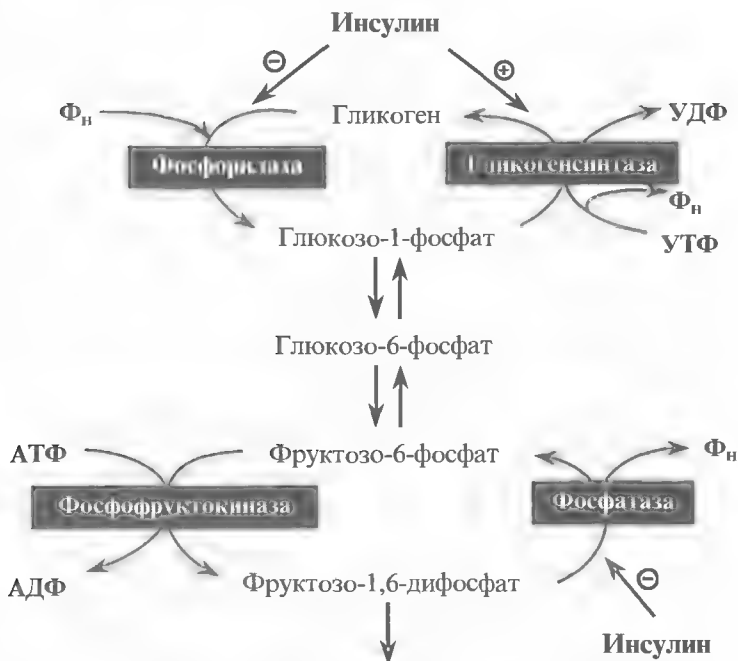


Рис. 3.13. Регуляция инсулином метаболизма углеводов. (—) — ингибирующее влияние; (+) — активирующее влияние; Φ_n — неорганический фосфат; УТФ — уридинтрифосфат; УДФ — уридиндифосфат.

• Чувствительность инсулиновых рецепторов увеличивают физическая нагрузка, соблюдение диеты и прием любых сахароснижающих препаратов вследствие уменьшения уровня глюкозы в крови. Эффекты инсулина на рецепторы выше в вечерние часы, чем в утренние (что связывают, в частности, с циркадным ритмом глюкокортикоидов, секреция которых достигает максимума с 3 до 7 ч утра). Поскольку глюкокортикоиды обладают контринсулярным свойством, потребность в инсулине выше в утренние часы (что важно при расчете суточной дозы инсулина).

Мутации гена рецептора инсулина (ген INSR). Известно множество мутаций гена INSR, приводящих к полной или частичной резистентности мишеней к эффектам инсулина, что проявляется развитием инсулиннезависимого сахарного диабета. В качестве примеров клинических форм, возникающих при мута-

циях гена INSR, можно привести лепречаунизм, инсулиннезависимый сахарный диабет с акантозом кожи чернеющим и синдромом Рабсона–Менденхолла.

Глюкагон

Основные мишени глюкагона — гепатоциты и жировые клетки. Глюкагон расценивают как антагонист инсулина, этот гормон стимулирует гликогенолиз и липолиз, что ведет к быстрой мобилизации источников энергии (глюкозы и жирных кислот). Таким образом, глюкагон — гормон с катаболическим действием.

Рецептор глюкагона расположен в плазмолемме клеток-мишеней, связывает только глюкагон и посредством G-белков активирует аденилатциклазу.

Сахарный диабет

При недостаточной секреции инсулина или его неадекватном действии на мишени развивается сахарный диабет. В 1981 г. Комитет экспертов ВОЗ определил сахарный диабет как синдром хронической гипергликемии, развивающийся вследствие абсолютного или относительного дефицита инсулина и проявляющийся глюкозурией, полиурией, полидипсией, нарушениями липидного, белкового и минерального обмена и развитием характерных осложнений (острых и хронических).

Традиционно выделяют два типа сахарного диабета: инсулинзависимый (тип I) и инсулиннезависимый (тип II), различаемых по патогенетическим механизмам. К причинам сахарного диабета I типа относят вирусное поражение поджелудочной железы, образование ауто-АТ к инсулину или генетический дефект системы синтеза этого гормона. Диабет II типа развивается чаще всего у тучных людей. Его причина — не низкий уровень инсулина в крови, а сниженная экспрессия рецепторов инсулина в тканях-мишенях или же нарушения в системе проведения регуляторного сигнала от рецептора инсулина к переносчику глюкозы в плазматической мембране клеток. Больные инсулиннезависимым сахарным диабетом составляют 80–90% всех больных сахарным диабетом.

Следует отметить, что концентрация глюкозы в крови возрастает не только из-за нехватки инсулина или замедленного транспорта углеводов в клетку, но и при синдроме Кушинга, феохромоцитоме, акромегалии, гигантизме, гипертиреозе, при гиперпродукции эстрогенов или прогестиннов, при беременности, инфаркте миокарда, нарушении мозгового кровообращения, эмоциональном возбуждении, отравлении углекислым газом, ожогах, шоке, лихорадке.

Пониженный уровень инсулина в крови наблюдают не только при инсулинзависимой форме сахарного диабета, но также в большинстве случаев при поздней стадии инсулиннезависимого сахарного диабета (так называемая инсулинопотребная стадия инсулиннезависимого сахарного диабета). Гиперинсулинемия развивается при опухолях поджелудочной железы, инсулиннезависимой форме сахарного диабета, при панкреатитах и ожирении, болезни Кушинга, тиреотоксикозе и акромегалии, а также при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки.

ОСТРЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Крайнее проявление инсулиновой недостаточности — диабетический кетоацидоз. В его патогенезе важно отметить роль гипергликемии, метаболического ацидоза и электролитных нарушений.

Абсолютный дефицит инсулина снижает утилизацию глюкозы на периферии, приводит к энергетическому голоду в инсулинзависимых тканях, что вызывает повышение уровней контринсулярных гормонов (глюкагона, АКТГ, гормона роста, кортизола, катехоламинов), и стимуляции гликогенолиза, липолиза и протеолиза, то есть метаболических путей, поставляющих субстраты для глюконеогенеза в печени и в меньшей степени в почках. В результате повышения осмолярности плазмы развиваются осмотический диурез (с потерей натрия, калия, фосфата и других веществ с мочой), дегидратация тканей, гиповолемия (с уменьшением мозгового, почечного и периферического кровотока и последующей олиго- и анурией). В результате развивается гипоксия тканей с переключением их метаболизма на гликолитический путь и накоплением лактата. Повышенный уровень глюкозы в крови больных увеличивает тоническое (осмо-

тическое) давление в межклеточном пространстве, что приводит к выходу воды из клетки. Этот процесс — главная причина потери жидкости, а также ионов Na^+ , K^+ и Cl^- при сахарном диабете. Неспособность глюкозы поступать в мышцы и печень при сахарном диабете приводит к снижению массы тела, а потеря воды и электролитов (особенно K^+) вызывает мышечную слабость.

Метаболический ацидоз (см. гл. 1) имеет смешанное происхождение. Повышенное образование в печени кетоновых тел (кетогенез) превышает способность организма к их метаболизированию или экскреции. Липолиз (преобладающий над липогенезом), возникающий в результате дефицита инсулина и избытка контринсулярных гормонов (главным образом катехоламинов), мобилизует свободные жирные кислоты из депо в жировой ткани. Вместо реэтерификации поступающих свободных жирных кислот в триглицериды печень переключает их метаболизм на образование кетоновых тел, опосредованное продукцией ацетил-КоА с формированием сначала ацетоацетата (первое кетоновое тело), из которого образуются β -гидроксибутират (второе кетоновое тело) при участии НАДФ и ацетон без участия НАДФ. Дополнительный компонент метаболического ацидоза — лактат-ацидоз, возникающий за счет переключения метаболизма «голодающих» тканей на гликолитический путь с образованием лактата на фоне относительного дефицита ЛДГ и невозможности полной утилизации лактата.

Электролитные нарушения возникают не только за счет осмотического диуреза (см. выше), но и за счет назначения инсулинотерапии. Главное из нарушений — гипокалиемия, поскольку инсулин усиливает транспорт калия в клетку, а также экскрецию калия с мочой. Эффекты инсулинотерапии на выведение калия проявляются через 2–3 ч от ее начала (поэтому именно тогда и следует начинать заместительную терапию калием с помощью раствора калия хлорида).

ХРОНИЧЕСКИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Основную роль в развитии хронических осложнений сахарного диабета играют длительная гипергликемия и гликозилирование белков крови. Особенно важно отметить повреждающее

действие этих факторов на кровеносные сосуды (коронарные артерии, сосуды мозга и нижних конечностей, а также почек и сетчатки глаза). Обычно развиваются утолщение базальной мембраны в капиллярах, пролиферация ГМК и усиленная секреция коллагена в крупных сосудах, микроаневризмы и повышенная проницаемость капилляров в сетчатке глаза.

При длительной гипергликемии происходят стимуляция гликозилирования ЛП и других белков в плазме крови, вследствие чего эти белки депонируются в стенках сосудов и тем самым стимулируют агрегацию тромбоцитов, а также миграцию и адгезию моноцитов и макрофагов. Биохимические механизмы развития подобных изменений в сосудах точно не установлены. Есть свидетельства в пользу того, что гипергликемия повышает гликозилирование белков плазмы путем неферментативного ковалентного присоединения глюкозы к свободным аминок группам белка, в результате чего изменяется его третичная структура. Важную роль может играть также стимуляция глюкозой агрегации тромбоцитов, которые при этом секретируют тромбоцитарный фактор роста, способный стимулировать гиперплазию и гипертрофию сосудистых клеток. Гиперинсулинемия *per se* также вносит свой вклад в развитие патологии сосудов. При инсулиннезависимой форме сахарного диабета уровень инсулина в крови может быть повышен в несколько раз.

Помимо того что инсулин действует как гормон, его также относят к типичным факторам роста. Связываясь со своим рецептором, а также (при высоких концентрациях) с рецептором инсулиноподобного фактора роста, он стимулирует тирозиновое фосфорилирование ряда белков клетки, в результате чего происходят гиперплазия и гипертрофия клеток сосудистой стенки и крови.

Таким образом, основные патогенетические процессы при хронических осложнениях сахарного диабета развиваются в кровеносных сосудах. Они вызваны не нарушением метаболизма углеводов в клетке, а химической модификацией внеклеточных (гликозилирование) и внутриклеточных (фосфорилирование по тирозиновым остаткам) белков.

Диагностика и мониторинг

Диагностика сахарного диабета налагает особую ответственность на клинических биохимиков, поскольку данное заболевание имеет не только медицинское, но и социальное значение. Для постановки диагноза и последующего длительного мониторинга пациентов используют следующие тесты.

ГЛЮКОЗА МОЧИ

Как правило, в норме глюкоза не содержится в моче, поэтому уринарный глюкотест является одним из самых распространенных методов скринингового анализа в поликлиниках и стационарах.

Глюкозурия наблюдается у пациентов при превышении уровня глюкозы в крови 10 ммоль/л. Необходимо учитывать, что у отдельных здоровых индивидуумов с низким почечным порогом для глюкозы может наблюдаться глюкозурия без наличия сахарного диабета. С другой стороны, с возрастом характерно увеличение почечного порога для глюкозы и у многих пожилых больных диабетом глюкозурия отсутствует. Таким образом, при интерпретации данных уринарного глюкотеста всегда надо учитывать то, что уровень глюкозы в моче зачастую не является прямым отражением ее уровня в крови.

КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА В МОЧЕ И ПЛАЗМЕ

В плазме у больных сахарным диабетом могут накапливаться кетоновые тела, однако их присутствие также не является явным признаком заболевания. Это связано с тем, что кетоновые тела присутствуют и в норме в том случае, если у пациента были достаточно длительные промежутки между приемами пищи. В клинической лаборатории для определения кетоновых тел используют тест-полоски на наличие ацетоацетата.

ГЛЮКОЗА КРОВИ

Современные тесты основаны на высокоспецифических ферментативных реакциях и дают достаточно точные результаты анализа. Концентрация глюкозы при этом определяется как визуально, так и с помощью портативных приборов. Все это позволяет больным диабетом осуществлять бытовой самокон-

троль уровня глюкозы в крови. При этом каждый использующий портативную тест-систему должен соблюдать следующие правила.

- Во-первых, точно следовать инструкции к тест-системе. Различные производители данных систем используют тонкие модификации метода, поэтому даже нюансы в нанесении образца на полоску могут существенно сказаться на конечном результате. Особенно это надо учитывать при смене фирмы-производителя тест-системы.

- Во-вторых, неправильное хранение полосок может сказаться на аналитической ценности результата. Любое нарушение условий длительного хранения обязательно отразится на чувствительности полоски, представляющей собой сложное многослойное образование на твердой подложке.

- В-третьих, любые аномальные результаты должны обязательно проверяться в лабораторных условиях, где к образцам крови перед анализом обязательно добавляют ингибиторы гликолиза.

Согласно рекомендациям ВОЗ (табл. 3.2), существуют вероятностные критерии для диагностики сахарного диабета в зависимости от образца измерения. Этими критериями рекомендовано пользоваться при проведении портативных глюкотестов.

Таблица 3.2. Критерии ВОЗ для диагностики сахарного диабета по случайным определениям глюкозы (в ммоль/л)

Образец	Сахарный диабет		
	вероятный	неопределенный	маловероятный
Венозная плазма	> 11,1	5,5–11,1	< 5,5
Венозная кровь	> 10,0	4,4–10,0	< 4,4
Капиллярная плазма	> 12,2	5,5–12,2	< 5,5
Капиллярная кровь	> 11,1	4,4–11,1	< 4,4

ГЛЮКОЗОТОЛЕРАНТНЫЙ ТЕСТ

Наиболее информативным методом диагностики диабета считается динамика изменения уровня глюкозы в плазме пациента

в ответ на сахарную нагрузку. Натощак определяется уровень глюкозы, а затем обследуемый получает 75 г глюкозы перорально в 300 мл воды, выпиваемой за 5 мин. Уровень глюкозы измеряется каждые 30 мин на протяжении 2 ч. При этом пациенты должны удобно сидеть, не курить и не испытывать физических нагрузок, а 3 дня до теста обязаны придерживаться сбалансированной диеты.

Подходы к интерпретации глюкозотолерантного теста представлены в табл. 3.3. При этом необходимо учитывать, что у пациентов с отсутствием каких-либо других симптомов вывод о наличии сахарного диабета делается только тогда, когда наблюдается увеличение уровня глюкозы на 2-м часу, или когда определяемое значение равно (превышает) 11 ммоль/л в любой временной точке глюкозотолерантного теста.

Таблица 3.3. Критерии ВОЗ для нарушенной толерантности к глюкозе (в ммоль/л)

Образец	Измерение	Диабет	Нарушенная толерантность
Венозная плазма	Натощак Через 2 ч	> 7,8 > 11,1	< 7,8 7,8–11,1
Венозная кровь	Натощак Через 2 ч	> 6,7 > 10,0	< 6,7 6,7–10,0
Капиллярная плазма	Натощак Через 2 ч	> 7,8 > 12,2	< 7,8 8,9–12,2
Капиллярная кровь	Натощак Через 2 ч	> 6,7 > 11,1	< 6,7 7,8–11,1

Если у пациента уровень глюкозы в крови натощак нормальный, а диабетических значений он достигает только спустя 2 ч, то тест повторяют через 6 нед.

Обнаруженная по результатам теста нарушенная толерантность к глюкозе не расценивается как болезнь. Это всего лишь сигнал о том, что обследуемый находится в промежуточной стадии между нормой и болезнью, характеризуемой повышенным риском развития диабета. Такие индивидуумы должны соблюдать диету и проходить ежегодную диспансеризацию.

Долговременные показатели

Как уже отмечалось выше, высокая концентрация глюкозы в биологических жидкостях приводит к неферментативному гликозилированию остатков лизина в различных белках. Этот процесс необратим при физиологическом значении pH, поэтому концентрация гликозилированных белков является отражением долговременного повышения уровня глюкозы. В клинической лаборатории обычно измеряют содержание гликозилированного гемоглобина и фруктозамина.

Гликозилированный гемоглобин (гемоглобин A_{1c}). Этот показатель отражает уровень гликемии в крови на протяжении 2 мес, т. е. за период времени полужизни гемоглобина.

Фруктозамин. Источником этого белка служит гликозилированный альбумин. Фруктозамин имеет меньший период жизни и отражает уровень глюкозы в течение 3 нед до измерения.

К долговременным лабораторным показателям при сахарном диабете относится и определение микроальбуминурии, позволяющее провести раннюю диагностику почечных осложнений.

Лабораторная диагностика метаболических осложнений

Метаболические осложнения сахарного диабета, в частности кетоацидоз и гипогликемия, представляют собой угрожающие жизни состояния и могут вызывать неврологические нарушения — у больных диабетом часты нарушения сознания. Рассмотрим некоторые особенности биохимического обследования больных сахарным диабетом в стадии осложнений.

- Во-первых, необходимо удостовериться в наличии гипергликемии и кетоза. Оба исследования можно провести с помощью индикаторных полосок с последующим обязательным лабораторным подтверждением.

- Во-вторых, должны быть взяты образцы: венозной крови для определений глюкозы в плазме и натрия, калия, хлоридов, бикарбонатов, мочевины и креатинина в сыворотке; артериальной крови для измерения газового состава. Необходимо учитывать, что наличие кетоновых тел в сыворотке мешает опреде-

лению креатинина, поэтому этот показатель может быть ложно повышенным в острой стадии. Реальный уровень креатинина определяется только после возвращения кетонемии в нормальные границы.

- В-третьих, надо учитывать, что активность сывороточной амилазы возрастает во время диабетического кетоацидоза, т. е. наличие у больного панкреатита может рассматриваться лишь при стойких абдоминальных болях.

- В-четвертых, глюкоза крови должна определяться еже часно до тех пор, пока уровень не снизится до значений ниже 15 ммоль/л. После этого рекомендуемая частота измерений составляет 1 раз в 2 ч. Эти исследования должны подтверждаться каждые 3 ч лабораторными анализами.

- В-пятых, частота мониторинга газов крови должна составлять как минимум 1 раз в 2 ч. Уровень калия в плазме также измеряется не реже 1 раза за 2 ч, тогда как мочевины и электролиты определяются с 4-часовым интервалом.

ГЛАВА 4 БИОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

4.1. СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТАЯ ПАТОЛОГИЯ

В области сердечно-сосудистой патологии клиническая биохимия наибольших успехов достигла в диагностике инфаркта миокарда. Методы клинической энзимологии и иммунохимии позволяют диагностировать инфаркт миокарда в первые часы его возникновения, выявить клиническое состояние нестабильной стенокардии, провести дифференциальную диагностику тяжелого приступа стенокардии (ишемии) и гибели миоцитов (аноксия), оценить эффективность тромболитической терапии и феномен реперфузии.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ диагноз инфаркта миокарда основан на типичной клинической картине приступа болей за грудиной; изменениях показателей ЭКГ; повышении в крови активности кардиоспецифических ферментов (маркеров).

В то же время при повторных инфарктах миокарда, кардиосклерозе и мерцательной аритмии, а также при наличии у больного водителя ритма (пейсмейкера) поставить диагноз инфаркта миокарда по данным ЭКГ значительно труднее. Кроме того, более 25% больных, у которых инфаркт миокарда подтвержден при аутопсии, не имели изменений на ЭКГ. По данным проспективного исследования, проведенного в США, диагноз инфаркта миокарда без исследования кардиоспецифических маркеров гибели миоцитов можно поставить только в 25% случаев.

Среди пациентов, доставляемых в блок интенсивной терапии с болями в сердце, только у 10–15% имеется инфаркт миокарда. Необходимость диагностики инфаркта миокарда в ранние сроки продиктована тем, что тромболитическая терапия в первые 2–6 ч

снижает раннюю смертность в среднем на 30%, а терапия, начатая через 7–12 ч, — лишь на 13%. Тромболитическая терапия через 13–24 ч не снижает уровень смертности.

Ранняя постановка диагноза инфаркта миокарда позволяет применить и транслюминальную ангиопластику, да и эффективность консервативного лечения выше, если оно начато возможно раньше. Необходимо также провести дифференциальную диагностику инфаркта миокарда с нестабильной стенокардией, когда рано начатое лечение может предотвратить инфаркт миокарда.

В последние годы арсенал биохимических маркеров гибели миоцитов пополнился новыми высокоспецифичными тестами, которые позволяют диагностировать инфаркт миокарда в первые часы его возникновения. Это тесты, которые можно применить на первом этапе оказания медицинской помощи, а также определение кардиоспецифических изоферментов и белков-маркеров гибели миоцитов, использующихся в блоке интенсивной терапии медицинских учреждений. В то же время успехи промышленной технологии и выпуск диагностических систем, основанных на принципе «сухой химии», дают возможность определить специфичные маркеры гибели миоцитов уже на первом этапе оказания медицинской помощи. Однако и в этих условиях возможны диагностические ошибки, если четко не представлять патофизиологию инфаркта миокарда и механизмы поступления в кровь органоспецифических и неспецифических белков-маркеров гибели миоцитов.

Локализация в клетке оказывает существенное влияние на скорость выхода маркера из поврежденного миоцита. Цитозольные ферменты высвобождаются быстрее, чем структурированные на внутриклеточных мембранах. В отличие от цитозольных маркеров для выхода в интерстициальное пространство структурно-связанных белков требуется деструкция внутриклеточного сократительного аппарата, что замедляет процесс появления маркеров в крови; последними высвобождаются митохондриальные ферменты.

При исследовании кардиальных маркеров инфаркта миокарда необходимо принимать во внимание ряд положений, именуемых принципами диагностики инфаркта миокарда. К ним относят: 1) временные интервалы; 2) исследование маркеров поражения

миокарда в динамике; 3) органоспецифичность лабораторной диагностики инфаркта миокарда; 4) комплексный характер диагностики; 5) понятие «серая зона».

Практически значимые маркеры гибели миоцитов — каталитическая концентрация в крови КК, ЛДГ, АСТ, гликогенфосфоорилазы (ГФ), повышение в крови содержания миоглобина, цепей миозина, тропонинов Т и I. Для поражения только кардиомиоцитов (но не миоцитов скелетных мышц) специфично определение в крови концентрации изоферментов КК-МВ и ЛДГ₁, иммунохимическое определение КК-МВ и ГФ-ВВ, а также соотношения изоформ изофермента КК-МВ и тропонинов.

При диагностике инфаркта миокарда важно учитывать время, прошедшее с момента приступа стенокардии. Это обусловлено тем, что от момента гибели миоцитов до появления в крови маркеров проходит довольно длительный период. Истечение из клеток больших белковых молекул (КК и ЛДГ) может происходить только при нарушении целостности плазматической мембраны миоцитов в результате их гибели при аноксии. Менее крупные молекулы белков-маркеров (миоглобин, тропонин) могут истекать в небольшом количестве из клеток и в условиях длительной гипоксии при выраженном изменении мембраны миоцитов, опережая деструкцию клеток. В первые 4 ч после окклюзии коронарной артерии в зоне максимальной ишемии некротизируется около 60% миоцитов; некроз остальных 40% наступает в течение последующих 20 ч.

Выходя за пределы мембраны миоцита, белковые молекулы попадают в межклеточную жидкость и оттекают от сердца только по лимфатическим путям. Это и определяет довольно длительный промежуток времени (3–6 ч) от момента гибели миоцитов до появления кардиоспецифических маркеров в крови. Прежде всего в крови повышается содержание миоглобина, ГФ-ВВ и тропонина, далее — КК и кардиоспецифического изофермента КК-МВ, АСТ; существенно позже возрастает активность ЛДГ и кардиоспецифического изофермента ЛДГ₁ (рис. 4.1). Клиническая чувствительность кардиоспецифических маркеров во многом зависит от времени, которое прошло с момента гибели миоцитов. Так, для КК-МВ при определении в крови в первые 3–4 ч после приступа стенокардии клиническая чувствительность (диагно-

стическая достоверность) составляет только 25–45% и возрастает до 98% в интервале 8–32 ч. В сроки ранее 8 ч определение активности КК дает ложноотрицательные результаты в 32% случаев, АСТ — в 49%, миоглобина — в 15%. Активность ЛДГ — достоверный маркер гибели миоцитов после 12 ч от начала приступа стенокардии, но она остается повышенной в течение 10–12 дней. Данные об активности кардиоспецифических маркеров в сроки менее 4–6 ч после приступа стенокардии могут приводить к диагностическим ошибкам, когда даже при обширном инфаркте миокарда маркеры гибели миоцитов окажутся не столь информативными. Кроме того, скорость нарастания содержания кардиальных маркеров в крови в значительной степени зависит от длительности ишемии и времени реканализации тромбированной коронарной артерии и реперфузии миокарда после инфаркта.

Вторая особенность выхода в кровь маркеров гибели кардиомиоцитов — характерная динамика нарастания и убывания их концентрации (каталитической концентрации). Это определено постоянным сокращением миокарда, что приводит вначале к быстрой элиминации белков из некротизированного участка миокарда, а затем к полному вымыванию в кровь белков-маркеров. Только при инфаркте миокарда содержание в крови маркеров гибели кардиомиоцитов увеличивается в интервале 8–24 ч. При неосложненном течении инфаркта миокарда далее происходит столь же заметная элиминация белков-маркеров из сосудистого русла. При этом содержание каждого из маркеров «выписывает» дугообразную динамичную кривую с разными временными параметрами. Для большинства маркеров площадь кривой дает

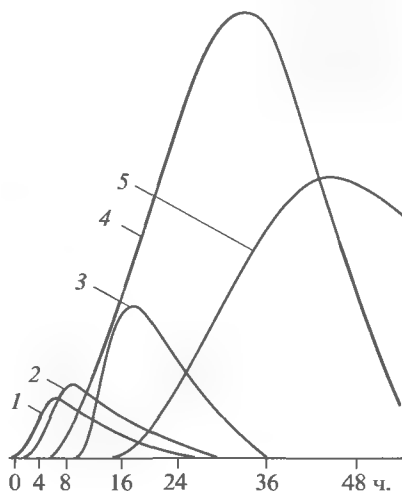


Рис. 4.1. Динамика активности ферментов при инфаркте миокарда. 1 — МВ-2/МВ-1; 2 — ММ-3/ММ-1; 3 — КК-МВ; 4 — КК суммарная; 5 — ЛДГ₁/ЛДГ₂.

представление о величине инфаркта миокарда, отражая количество некротизированной ткани миокарда. Активность в крови КК и КК-МВ повышается уже при гибели 1 г ткани миокарда.

Однократное исследование АСТ, КК или ЛДГ обладает сравнительно низкой клинической специфичностью — 66%, возрастание активности ферментов или содержания белков-маркеров через 3–4 ч повышает органоспецифичность диагностики до 86%, третье измерение позволяет диагностировать инфаркт миокарда при использовании даже столь малоспецифичного теста, как определение АСТ. Динамическое исследование маркеров гибели миоцитов позволяет провести дифференциальную диагностику между инфарктом миокарда и гиперферментемией при массивном поражении поперечнополосатых мышц. В сроки 8–24 ч после приступа стенокардии активность ферментов настолько показательна, что если нет динамичного нарастания их активности в крови, то нет и инфаркта миокарда.

Абсолютно специфических маркеров поражения кардиомиоцитов не найдено. Органоспецифичность при диагностике с помощью изоферментов КК основана только на различии процентного соотношения изоферментов в отдельных органах и тканях, а следовательно, и в сыворотке крови при их поражении.

Значение КК-МВ. Изофермент КК-МВ специфичен для миокарда не потому, что в других тканях такого изофермента нет, а потому, что в кардиомиоцитах его активность составляет 15–42% общей активности КК, в то время как в ткани скелетных мышц его содержание не превышает 4%, да и то только в красных, медленно сокращающихся мышечных волокнах. В этих условиях при поражении миокарда и скелетной мускулатуры активность КК может быть повышена в одинаковой степени, но в процентном отношении активность КК-МВ будет существенно отличаться. При инфаркте миокарда содержание КК-МВ превышает 6% общей активности КК или 12 МЕ/л при температуре 30 °С.

Как при патологии скелетных мышц, так и при гибели кардиомиоцитов в крови повышена активность КК-МВ, но в первом случае ее активность не превысит 6% активности КК, а во втором случае повысится до 12–20%. Целесообразно выражать активность КК-МВ одновременно в единицах на 1 л

(МЕ/л) и в процентах от активности КК. Определение активности КК-МВ остается самым популярным тестом в диагностике инфаркта миокарда. При инфаркте миокарда у лиц пожилого возраста активность КК может быть повышена только в малой степени, но при достоверном повышении активности КК-МВ. У таких больных диагностически важно исследовать активность КК-МВ даже при не столь значительном повышении активности КК.

При операциях на сердце (пороки сердца, коронарное шунтирование) активность КК-МВ используют для диагностики послеоперационного инфаркта миокарда. Сразу после операции вследствие гипоксии и повреждения миокарда активность КК-МВ в крови повышается и возвращается к норме в течение 10–12 ч. При развитии инфаркта миокарда активность КК-МВ повышается более значительно и имеет динамику, характерную для инфаркта миокарда.

Значение ЛДГ. Активность ЛДГ₁ характерна для миокарда как для ткани с анаэробным типом обмена. В условиях гипертрофии миокарда и хронической гипоксии синтез ЛДГ₁ в кардиомиоцитах начинает увеличиваться. При инфаркте миокарда повышение каталитической концентрации ЛДГ в крови происходит за счет возрастания содержания изоферментов ЛДГ₁ и ЛДГ₂ при соотношении ЛДГ₁/ЛДГ₂ более 1. ЛДГ — цитозольный фермент; достоверное повышение активности ЛДГ в крови при инфаркте миокарда происходит позже, чем КК и АСТ, — в течение 1-х суток после приступа стенокардии; высокая активность ЛДГ₁ сохраняется на протяжении 12–14 дней. Именно снижение активности ЛДГ в крови до нормы используют в качестве теста, который указывает на завершение периода резорбции некротизированной ткани миокарда. Если активность ЛДГ₁, определенная прямым методом, при ингибировании субъединицы М антителами превышает 100 МЕ/л, это служит достоверным признаком инфаркта миокарда.

В отличие от субъединицы М и изоферментов ЛДГ₃ (ММНН), ЛДГ₄ (НМММ) и ЛДГ₅ (ММММ) субъединица Н и изофермент ЛДГ₁ (НННН) в меньшей степени ЛДГ₂ (НННМ), могут в качестве субстрата использовать не только лактат и пируват, но и α -гидроксibuтират. Это послужило основой

предложения оценивать активность ЛДГ₁ в крови, используя в качестве субстрата α -гидроксibuтират; при этом изофермент ЛДГ₁ именуют α -гидроксibuтиратдегидрогеназой (α -ГБДГ). При инфаркте миокарда исследование активности общей ЛДГ и α -ГБДГ дает сходные результаты. Если же активность ЛДГ в крови повышается в результате иного патологического процесса, активность ЛДГ будет существенно выше активности ЛДГ₁ и α -ГБДГ при отсутствии характерной для инфаркта миокарда динамики.

При инфаркте миокарда не отмечено достоверной зависимости между активностью КК-МВ и ЛДГ₁ во все сроки инфаркта, что происходит в результате существенного различия динамики и сроков повышения в крови активности этих изоферментов.

Молекулы ферментов, попавших в кровь после гибели кардиомиоцитов, — патологические компоненты плазмы крови и поэтому подлежат удалению. В зависимости от размеров молекул маркера некоторые белки, например миоглобин, экскретируются в мочу или их фагоцитируют клетки моноцитарно-макрофагальной системы. Однако перед тем как молекулы КК-МВ и КК-ММ будут фагоцитированы макрофагами, они в крови подвергаются последовательному действию протеаз, в результате чего образуются фрагменты изоферментов КК-МВ и КК-ММ.

В миоцитах изофермент КК-ММ представлен одной формой ММ-3. В крови карбоксипептидаза последовательно отщепляет конечные аминокислотные остатки лизина от каждого из 2 номерных, последовательно образуя изоформы ММ-2 и ММ-1. Определение изоформ КК-ММ и КК-МВ методом ЭФ и расчет их соотношения позволяют с точностью до 1 ч установить время гибели кардиомиоцитов. Соотношение изоформ ММ и МВ изменяется раньше, чем повышается активность КК-МВ.

Энзимодиагностика инфаркта миокарда в клинико-диагностических лабораториях имеет комплексный характер. Сначала определяют активность АСТ, КК и ЛДГ, затем исследуют активность КК-МВ и ЛДГ₁. Комплексный подход к энзимодиагностике обусловлен, во-первых, тем, что при исследовании активности одного фермента можно допустить ошибку; во-вторых, каждый из указанных ферментов отличается по диагностической значимости и динамике (время появления в крови и скорость

элиминации из сосудистого русла). Кроме неточностей, которые могут быть допущены на преаналитическом (взятие крови на анализ) и аналитическом этапах, существуют объективные причины, влияющие на результаты определения активности ферментов. Сложности возникают, когда инфаркт миокарда развивается на фоне тяжелых соматических заболеваний, при осложнении инфаркта миокарда кардиогенным шоком, при септицемии.

Несмотря на клиническую специфичность активности КК для инфаркта миокарда (98%), в отдельных случаях повышение активности КК и КК-МВ не удается выявить даже в условиях верификации диагноза инфаркта миокарда по данным ЭКГ. Это происходит в тех случаях, когда инфаркт развивается на фоне почечной недостаточности и накопления уремических токсинов (среднемолекулярные пептиды), у пациентов с циррозом печени и недостаточностью детоксикационной активности гепатоцитов, при септицемии и эндогенной интоксикации, при выраженном метаболическом (или дыхательном) ацидозе. В этих условиях в крови накапливается столь большое количество неспецифических ингибиторов, что активность КК и КК-МВ практически не определяется. В таких случаях определить активность КК удастся только после проведения непопулярной в клинической биохимии процедуры разведения сыворотки крови, когда снижение концентрации ингибиторов позволяет проявиться активности фермента.

Присутствие в крови ингибиторов КК и КК-МВ побудило разработать иммунохимический способ определения в крови не каталитической активности, а содержания КК-МВ по молекулярной массе этой формы. Это существенно улучшило чувствительность метода и воспроизводимость результатов. Хотя при неосложненном инфаркте миокарда активность КК-МВ и содержание белка КК-МВ хорошо коррелируют, определить содержание КК-МВ в крови удастся на несколько часов раньше, чем фермент проявляет активность. Достоверное повышение в крови уровня белка КК-МВ отмечено у половины больных уже через 3 ч, а через 6 ч после приступа стенокардии высокий уровень белка отметили у всех больных с клинической картиной инфаркта миокарда. Уже через 90 мин после тромболизиса уровень белка КК-МВ в крови увеличивается в несколько раз. У боль-

ных нестабильной стенокардией возрастание содержания белка КК-МВ отмечено чаще, чем повышение активности изофермента. В то же время, несмотря на производство диагностических наборов разными фирмами, вопрос о стандартизации метода определения количества КК-ВМ окончательно не решен.

Значение гликогенфосфоорилазы. Среди ферментных и изоферментных маркеров в диагностике инфаркта миокарда клинические биохимики определяют активность ГФ и ее изофермента ГФ-ВВ. ГФ — цитозольный фермент, который катализирует в клетке отщепление глюкозы от гликогена.

В тканях человека присутствуют 3 изофермента ГФ: ГФ-ЛЛ в печени, ГФ-ММ в миоцитах и ГФ-ВВ в ткани мозга. В миокарде человека присутствуют изоферменты ГФ-ВВ и ГФ-ММ, в миоцитах скелетной мускулатуры — только ГФ-ММ. ГФ-ВВ — наиболее чувствительный тест для диагностики инфаркта миокарда в первые 3–4 ч после приступа стенокардии. По диагностической чувствительности в первые часы определение активности ГФ можно сопоставить только с определением в крови массы КК-МВ. У большинства больных уровень ГФ-ВВ достоверно увеличивался уже через 4 ч после приступа стенокардии и при неосложненном инфаркте миокарда возвращался к норме в течение 48 ч.

Значение миоглобина. Среди белков-маркеров инфаркта миокарда наиболее широкое распространение получило определение в крови содержания миоглобина (МГ). МГ — хромопротеин, который в цитозоле всех мышечных клеток транспортирует кислород главным образом к митохондриям. Молекулярная масса МГ всего 18 кД; его свойства близки в миоцитах скелетной мускулатуры и кардиомиоцитах. МГ постоянно присутствует в плазме крови в концентрации ниже 80 нг/мл. При инфаркте миокарда уровень МГ в крови повышается в 10–20 раз.

- Увеличение содержания МГ в крови — наиболее ранний тест для диагностики инфаркта миокарда; повышение уровня МГ в крови удается определить через 3–4 ч после приступа стенокардии. Это первое диагностическое значение МГ.

- Вторая особенность МГ в диагностике инфаркта миокарда состоит в том, что столь малая молекула свободно проходит через фильтрационный барьер почечных телец и быстро оказывается

в моче. Это определяет характер изменений содержания МГ в крови: оно быстро повышается и столь же быстро снижается. Только при определении МГ удастся диагностировать повторные инфаркты миокарда (рис. 4.2), развивающиеся через несколько часов после первого эпизода гибели кардиомиоцитов. Кроме того, в ряде клинических наблюдений отмечены существенные колебания уровня МГ в крови в 1-е сутки инфаркта миокарда, когда выраженное повышение через несколько часов сменяется столь же выраженным снижением.



Рис. 4.2. Динамика концентрации миоглобина в крови после повторного приступа стенокардии.

В ряде ситуаций уровень МГ в крови остается длительное время постоянно высоким. Это наблюдают при кардиогенном шоке, когда снижение сократительной функции приводит к гипотонии, падению гидростатического давления над почечной мембраной и прекращению гломерулярной фильтрации, когда МГ не может быть профильтрован в мочу. При этом наблюдается

положительная корреляция между содержанием МГ в крови положительно коррелирует с нарастанием уровня креатинина.

Основная структурная сократительная единица миоцита — саркомер, который образуют упорядоченно расположенные толстые и тонкие волокна. Тонкие содержат волокна актина и тропонин-тропомиозиновый комплекс.

Значение тропонинов. Тропоминовый регуляторный комплекс в поперечнополосатых мышцах состоит из 3 полипептидов; при диагностике инфаркта миокарда определяют в крови содержание только тропонина Т (Тн Т) и тропонина I (Тн I). Каждый из белков имеет 3 изоформы, синтез которых кодируют 3 разных гена. Как специфические маркеры гибели кардиомиоцитов используют миокардиальные изоформы Тн Т и Тн I (сердечный Тн Т и сердечный Тн I).

Определение содержания Тн Т позволяет провести диагностику инфаркта как в ранние, так и в поздние сроки. Содержание Тн Т в крови повышается уже через несколько часов после приступа стенокардии. В ранние сроки инфаркта миокарда клиническая чувствительность определения миоглобина и содержания КК-МВ оказываются выше, чем Тн Т, но с 3-го дня уровень Тн выходит на плато, которое сохраняется при постепенном снижении в течение 5–6 дней. Уровень Тн Т оказывается высоким в те сроки неосложненного инфаркта миокарда, когда уровень миоглобина и активность КК-МВ уже вернулись к норме, а в крови остается только высокая активность ЛДГ₁. В ряде случаев при определении Тн Т диагноз инфаркта миокарда можно поставить и в поздние сроки — через 8–10 дней после ангинозных болей. Особенно важно исследовать Тн Т у больных, которые поступили в стационар через 2–3 дня после приступа стенокардии; когда показатели КК и КК-МВ могут уже вернуться к исходному нормальному уровню. Кроме того, по сравнению с КК и КК-МВ содержание Тн Т в крови повышается в большей степени, что характеризует более высокую диагностическую чувствительность определения в крови содержания Тн Т.

Сравнительное исследование Тн Т и Тн I выявило более высокую диагностическую чувствительность Тн I. Так, уровень в крови Тн I при инфаркте миокарда может почти в 100 раз превышать верхнюю границу нормы. При небольшом по размерам

инфаркте миокарда уровень Тн I в крови повышается в большей степени, чем активность КК, КК-МВ и ЛДГ₁. Определение обеих форм Тн Т и Тн I предпочтительно при диагностике инфаркта миокарда, развивающегося в послеоперационном периоде и после активных реанимационных мероприятий.

Идеального маркера состояния кардиомиоцитов нет (табл. 4.1). В диагностике инфаркта миокарда клинические биохимики стремятся использовать наиболее органоспецифические изоферменты и определять белки-маркеры, содержащиеся только клетки миокарда. Вместе с тем для диагностики инфаркта миокарда в лабораториях продолжают определять и МГ. Однако при неосложненном инфаркте миокарда динамика содержания в крови неспецифического МГ практически повторяет таковую кардиоспецифического КК-МВ, опережая ее на 4–6 ч. В то же время попытки определять содержание МГ в моче для диагностики инфаркта миокарда успеха не имели.

4.2. БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

Несмотря на множество биохимических процессов, протекающих в клетках печени, изменения далеко не всех из них имеют диагностическое значение. Это обусловлено ограниченными методическими возможностями лаборатории, низким уровнем знаний о патофизиологии печени, а также однонаправленными изменениями ряда биохимических тестов.

Доминирующее значение в лабораторной диагностике заболеваний печени имеет определение активности ферментов. Синтезируемые гепатоцитами и клетками эпителия желчных протоков ферменты могут быть разделены на индикаторные, секреторные и экскреторные. К секреторным ферментам относят холестеразу, ее активность в крови при заболеваниях печени понижается вследствие нарушения ее синтеза. К экскреторным ферментам относят ЩФ, ГГТ и ЛАП. Наибольшую группу диагностически важных ферментов представляют индикаторные ферменты, включающие АЛТ, АСТ, ЛДГ и ГлДГ. В табл. 4.2 приведены указанные ферменты и их внутриклеточное распределение.

Широкое распространение в дифференциальной диагностике заболеваний печени получил способ сопоставления степени по-

Таблица 4.1. Сравнительная характеристика кардиальных маркеров сыворотки крови

Маркер	Молекулярная масса, кД	Диапазон нормальных значений	Верхняя граница «серой зоны»	Время подъема ^б , ч	Пик количества ^б , ч	Снижение уровня до нормы ^б	Степень повышения (во сколько раз)	Чувствительность 0-6 ч, %	Специфичность 0-6 ч, %
МГ	17	< 90 нг/мл	100 нг/мл	0,5-2	Через 5-12	Через 18-30 ч	5-20	50-100	77-95
КК	86	24-195 МЕ/л	200 МЕ/л	3-8	Через 10-36	Через 72-96 ч	5-25	50-75	80-98
КК-МВ	86	10-25 МЕ/л (< 5%) ^а 0-9 нг/мл (2,5) ^а	> 25 МЕ/л (5%) ^а 10 нг/мл (2,5) ^а	3-8	Через 9-30	Через 48-72 ч	5-20	17-62	92-100
Изоформы МВ	86	МВ < 2,6 МЕ/л МВ-2/МВ-1 > 1,4	МВ-2 > 2,6 МЕ/л МВ-2/МВ-1 > 1,5	1-4	Через 4-8	Через 12-24 ч	3-5	92-96	94-100
ЛДГ	135	35-88 МЕ/л	> 100 МЕ/л	8-18	Через 24-72	Через 6-10 дней	3-5	?	?
ЛДГ ₁	135	14-36% общ. ЛДГ ЛДГ ₁ /ЛДГ ₂ = 0,45-0,74	> 40% общ. ЛДГ ЛДГ ₁ /ЛДГ ₂ > 1	8-18	Через 24-72	Через 6-10 дней	5-10	?	?
с-Тн Т	39,7	< 0,1 нг/мл	0,1 нг/мл	3-6	Через 10-24	Через 10-15 дней	30-200	50-59	74-96
с-Тн I	22,5	< 0,5 нг/мл ^в или < 3 нг/мл ^в	0,15-2,0 нг/мл	3-6	Через 14-20	Через 5-7 дней	20-50	6-44	93-99

^а Процент или соотношение КК-МВ/общ. КК. ^б Время от начала болевого приступа. ^в Зависит от метода.

Таблица 4.2. Ферменты печени

Типы ферментов	Названия
Экскреторные	ЩФ, ЛАП, ГГТ
Секреторные	ХЭ, ЛДГ
Индикаторные:	АСТ, АЛТ, ЛДГ, ГДГ
цитоплазматические	АЛТ, ГГТ, ЛДГ
митохондриальные	ГлДГ
митохондриально-цитоплазматические	АСТ

вышения активности ферментов, имеющих разную локализацию в гепатоците и отражающих разные стороны функциональной активности поражений клетки. Наиболее используемые соотношения ферментов представлены в табл. 4.3.

При заболеваниях печени используют коэффициент Де Рити-са (соотношение активности АСТ/АЛТ). Соотношение АСТ/АЛТ более 2 характерно для алкогольного поражения, а менее 1 — для вирусного гепатита, холестатического синдрома. В большинстве случаев вирусного гепатита соотношение АСТ/АЛТ оставалось ниже 1. При вирусном гепатите в десятки раз возрастает активность АЛТ. При остром алкогольном гепатите активность АСТ выше АЛТ, при этом активность обоих ферментов не превышает 500–600 МЕ/л. У пациентов с токсическим гепатитом, инфекционным мононуклеозом, внутривенным холестазом, при циррозе, метастазах в печень, инфаркте миокарда активность АСТ выше, чем активность АЛТ. Активность АЛТ и АСТ возрастает при приеме эритромицина, парааминосалициловой кислоты, диабетическом кетоацидозе, псориазе, ее также используют для ранней диагностики безжелтушного гепатита.

В дифференциальной диагностике патологии печени важно исследовать соотношения активности изоферментов ЛДГ. Увеличение относительной активности изофермента ЛДГ₅ характерно для поражения гепатоцитов. Гиперферментемия ЛДГ в разной степени наблюдают при остром вирусном, лекарственном и гипоксическом гепатите, сердечной недостаточности, циррозе печени и внепеченочном холестазе, а также при снижении осмотической резистентности эритроцитов и гемолизе. Длительное повышение

Таблица 4.3. Соотношения ферментов печени

Название соотношения или коэффициента	Показатель
Де Ритиса	
Воспалительный тип: АСТ/АЛТ	≤ 1
Некротический тип: АСТ/АЛТ	≥ 1
АСТ+АЛТ/ГлДГ	
Метастазы и печень	≤ 10
Обструктивная желтуха Билиарный цирроз	5–20
В случае острого начала цирроза печени и хронического гепатита	30–40
Холестатический гепатоз	40–50
Острый вирусный гепатит Острый алкогольный гепатит	≥ 50
ЛДГ/АСТ	
Гемолитическая желтуха	≥ 12
Гепатоцеллюлярная желтуха	≤ 12
АЛТ/ГлДГ	
Обструктивная желтуха	≤ 10
Гепатоцеллюлярная желтуха	≥ 10
γ -ГТ/АСТ	
Активный вирусный гепатит Токсический гепатит Хронический персистирующий гепатит	≤ 1
Хронический гепатит Острый алкогольный гепатит Цирроз печени	1–3
Алкогольный цирроз Недавняя обструктивная желтуха	3–6
Билиарный цирроз Длительная обструктивная желтуха Рак печени/метастазы в печень	≥ 6

активности изоферментов ЛДГ₅ и ЛДГ₄ дает основание предположить наличие метастазов в печень.

В настоящее время в диагностике заболеваний печени все еще оценивают стабильность коллоидных систем по тимоловому и сулемовому тестам. Патологические результаты отражают ранние сроки острого гепатита, токсического поражения печени, обострения хронического гепатита. ЭФ белков сыворотки крови также дает неспецифические данные, но позволяет судить о характере патологического процесса. Процентное содержание альбумина, белков острой фазы и γ -глобулинов помогает в диагностике патологии печени: низкое содержание альбумина и высокий уровень γ -глобулинов характерны для цирроза печени. Повышение содержания в крови γ -глобулинов встречается также при жировой инфильтрации печени, воспалении желчных протоков, малигнизации.

Содержание альбумина в сыворотке крови имеет диагностическое значение при острой и хронической формах гепатита. Во всех случаях острого гепатита уровень альбумина в крови остается нормальным. Хронический гепатит сопровождается гипоальбуминемией и гипергаммаглобулинемией.

Печень — центральное звено регуляции свертывания крови. Гепатоциты синтезируют фибриноген, многие активаторы и ингибиторы каскада ферментативных реакций. Как острый, так и хронический гепатит нарушает эту регуляцию. К диагностическим тестам заболевания печени относят удлинение протромбинового времени, накопление в крови продуктов разрушения фибриногена. Острое поражение печени сопровождается усилением кровоточивости в условиях гипофибриногенемии.

Нарушение функций печени сопровождается изменением обмена ЛП. Гипертриглицеридемия характерна для разных форм патологии печени. Гиперхолестеринемия чаще возникает при закупорке желчных протоков и обтурационной желтухе. При хроническом гепатите в крови происходит накопление свободного холестерина в результате снижения его этерификации в сосудистом русле. В условиях выраженного холестаза наблюдается формирование холестатической макроформы ЛП — ЛП-Х, составляющей комплекс ЛП с фрагментом плазматической мембраны.

В большинстве случаев заболеваний печени этиологический фактор остается за рамками диагностики и клинические биохимики формируют диагноз, основываясь на принципах синдромальной диагностики.

Основные патологические процессы, формирующие лабораторную диагностику заболевания, следующие синдромы:

- цитолиза;
- внутриклеточного холестаза;
- внутripеченого и внепеченочного холестаза;
- токсического поражения гепатоцитов;
- недостаточности синтетических процессов в гепатоцитах;
- замедления инактивации токсических соединений;
- воспалительный.

Синдром цитолиза. Патофизиологическая основа синдрома цитолиза — нарушение целостности плазматической мембраны гепатоцитов и их органелл с развитием гиперферментемии. Выраженная гиперферментемия при поступлении в кровь цитозольных ферментов характерна для инфекционного гепатита, лекарственных и токсических повреждений печени, отравлений, декомпенсированных циррозов, перифокального воспаления паренхимы при холангитах. В энзимодиагностике синдрома цитолиза доминирует определение активности АЛТ, АСТ и ЛДГ. В норме активность как АЛТ, так и АСТ в крови не превышает 24 МЕ/л; в пределах 100 МЕ/л гиперферментемия рассматривают как «серую зону», что может быть связано с реактивными изменениями в гепатоцитах. Активность АЛТ выше 100 МЕ/л свидетельствует о поражении паренхимы печени. Увеличение активности АЛТ в 100–200 раз (до 2–6 тыс. МЕ/л) отражает обширное поражение гепатоцитов при вирусном гепатите и отравлении органическими растворителями.

Синдром внутripеченочного и внепеченочного холестаза. Синдром внутripеченочного холестаза определяет нарушение оттока желчи из печени. Увеличение объема гепатоцитов приводит к сдавлению ими желчных протоков, нарушению дренажной функции. Обтурация крупных желчных протоков — причина внепеченочного холестаза; наиболее выражен холестаз при механической желтухе. В табл. 4.4 приведены комбинации

лабораторных тестов, наиболее часто используемых для дифференциальной диагностики холестаза.

Таблица 4.4. Диагностика холестаза

Форма	Показатели
Холестаз без желтухи	ЩФ↑, ЛАП↑, ГГТ↑
Холестаз без желтухи, но с повреждением гепатоцитов	АЛТ↑, ГГТ↑, ХЭ↑, ЛАП↑, АСТ↑, ГлДГ↑
Холестаз с желтухой	ЩФ↑, ЛАП↑, ГГТ↑, билирубин↑
Холестаз с желтухой и повреждением гепатоцитов	ЩФ↑, ЛАП↑, ГГТ↑, билирубин↑ АЛТ↑, АСТ↑, ГлДГ↑

Достоверные маркеры синдрома внутрипеченочного холестаза — повышение в крови активности ЩФ, ГГТ и 5-нуклеотидазы. В мембране эпителия желчевыводящих протоков ферменты расположены близко друг от друга, поэтому при деструкции мембран их активность в кровотоке повышается одновременно и в равной степени.

Реактивные изменения в эпителии желчевыводящих путей и плазматических мембран гепатоцитов оценивают на основании активности ЩФ. Активность ЩФ помогает в дифференциальной диагностике внутри- и внепеченочного холестаза. При внепеченочной обструкции (камни желчных протоков, новообразование фатерова сосочка) активность ЩФ повышается в 10 раз и более. Внутрипеченочная обструкция при паренхиматозном поражении (гепатите) сопровождается повышением активности ЩФ в 2–3 раза. Острый некроз гепатоцитов может и не сопровождаться повышением активности ЩФ, если при этом не происходит сдавления желчных протоков (внутрипеченочный холестаз). Не при всех патологических процессах в печени наблюдают зависимость между активностью ЩФ и гипербилирубинемией. В ранние сроки внутрипеченочного холестаза повышение активности ЩФ — следствие активации ее синтеза; далее ее увеличение связано с деструкцией желчных канальцев при действии желчных кислот.

Синдром внутриклеточного холестаза. Увеличение размеров гепатоцитов и сдавления ими желчных ходов между дольками печени приводят к возникновению синдрома внутриклеточного холестаза с умеренным увеличением в крови активности ЩФ и ГГТ, поражению эпителия желчевыводящих протоков. Повышение в крови содержания желчных кислот — также ранний симптом холестаза.

Частый симптом заболеваний печени, сопровождающихся холестазом, — накопление в крови билирубина. Выраженность гипербилирубинемии недостоверна для дифференциальной диагностики внутри- и внепеченочного холестаза. В то же время гипербилирубинемия имеет прогностическое значение. Повышение уровня билирубина в 5 раз характерно для внутриспеченочного холестаза, увеличение концентрации билирубина в 10 раз более характерно для острого гепатита.

Синдром токсического поражения гепатоцитов развивается, например, при алкогольной интоксикации, когда явления цитолиза отсутствуют, но алкоголь нарушает функцию митохондрий.

При острой интоксикации алкоголем развивается синдром токсического поражения субклеточных образований, а нарушения целостности плазматических мембран в гепатоцитах не происходит. Токсическое влияние оказывают метаболиты алкоголя, в частности ацетальдегид, образующийся непосредственно в митохондриях. При этом в клетке нарушается образование макроэргических соединений, в частности АТФ, что оказывает патологическое влияние на процессы детоксикации ядовитых соединений. В остром периоде алкогольного гепатита в крови может доминировать активность АСТ за счет высокой активности не цитоплазматического, а митохондриального изофермента АСТ.

Вовлечение в патологический процесс митохондрий гепатоцитов сопровождается появлением в крови активности ГлДГ. Повышение активности ГлДГ — ранний тест алкогольного гепатита, однако 8–10-кратное повышение активности ГлДГ при умеренной активации АСТ и АЛТ характерно для обструктивной желтухи. Для токсического влияния алкоголя характерно выраженное повышение в крови активности ГГТ без значительного повышения активности ЩФ.

Синдром недостаточности синтетических процессов проявляется в снижении синтеза гепатоцитами транспортных белков, белков свертывающей системы крови, ХЭ.

ХЭ и ее изоферменты синтезируют гепатоциты. В условиях паренхиматозного поражения синтез ХЭ и ее активность в крови снижены. Чаще снижение в крови ХЭ возникает в результате токсического влияния (цитостатики, инсектициды, фунгициды, фториды). Физиологическое снижение активности ХЭ происходит при беременности. Отмечают редкие случаи генетически обусловленного снижения синтеза ХЭ.

При острой печеночной недостаточности гипогликемия развивается у каждого 4-го пациента. В условиях накопления промежуточных метаболитов и развития резистентности к инсулину возможно возникновение и гипергликемии. При длительном течении печеночной недостаточности возникает гиперинсулинемия (снижение разрушения гормона в печени). В условиях гипоксии и активации анаэробного гликолиза формируется метаболический ацидоз с накоплением в крови молочной кислоты (лактат-ацидоз). Метаболический ацидоз приводит к нарушению соотношения электролитов. Поражение паренхимы печени сопровождается снижением образования креатинина и мочевины. Естественно, что определенный вклад в это вносят неадекватное потребление белка, нарушение пищеварения. Однако основная причина гипокреатининемии — снижение синтеза креатинина в гепатоцитах. У пациентов с гепатитом к гипокреатининемии присоединяется снижение в крови уровня мочевой кислоты.

Синдром замедления инактивации токсических соединений обусловлен ингибированием их гидроксилирования в микросомальном аппарате гепатоцитов, что снижает скорость инактивации в организме многих лекарственных препаратов. В этих условиях даже низкая терапевтическая доза препарата может стать причиной выраженного побочного действия.

Печень служит биологическим барьером эндогенных и экзогенных токсичных соединений, которые в первую очередь поступают из ЖКТ. Оценку детоксикационной функции печени чаще проводят при хронических поражениях, используя нагрузочные тесты с галактозой, фенолтетрабромфталейнсульфоновой кислотой, бромциановым зеленым, мечеными соединениями. Нагру-

зочные тесты дают возможность диагностировать хронические формы заболевания, оценить остаточные явления перенесенного гепатита, составить представление о функции печени при циррозе, жировой инфильтрации печени.

В тяжелых ситуациях печеночной комы при остром вирусном гепатите или портальной гипертензии детоксикационную функцию печени оценивают на основании содержания в крови аммиака. Образование аммиака в кишечнике происходит постоянно в результате жизнедеятельности микроорганизмов и дезаминирования аминокислот, образующихся из белков пищи. В условиях массивных кровотечений из желудка или вен пищевода происходит усиленное образование аммиака из альбумина крови.

Воспалительный синдром обусловлен активацией клеток РЭС. Для него характерны увеличение в крови содержания белков острой фазы, диспротеинемия с нарушением соотношения белков сыворотки крови на электрофореграмме, изменение осадочных проб (тимоловой), повышение концентрации иммуноглобулинов.

Таблица 4.5. Диагностика заболеваний печени по ферментам

Ферменты	Особенность метода
АЛТ (или ГГТ) ↓	= базовый фермент
АЛТ + ГГТ + ХЭ ↓	= тройная проба
АЛТ + ГГТ + ХЭ + ЩФ ↓	= 4-ферментная проба
АЛТ + ГГТ + ХЭ + ЩФ + АСТ + ГлДГ ↓	= 6-ферментная проба
Соотношение ферментов	

Несмотря на многообразие описанных нарушений, использование приемов синдромальной диагностики эффективно уже на ранних стадиях заболеваний печени. Естественно, что результаты биохимических исследований в диагностическом процессе не единственны. Одновременно клиницисты используют данные анамнеза и объективного обследования, результаты радионук-

лидной диагностики, компьютерной томографии и биопсии печени. В то же время дифференциальную диагностику на ранних стадиях заболевания и оценку характера поражения гепатоцитов можно провести только на основании лабораторных исследований, главным образом данных клинической биохимии. Используемые комбинации лабораторных исследований представлены в табл. 4.5.

4.3. ПАТОЛОГИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

К основным факторам, регулирующим метаболизм фосфатов и кальция, относят ПТГ, кальцитонин и витамин D. ПТГ и кальцитонин поддерживают постоянство кальция в сосудистом русле и внеклеточной жидкости, влияют на всасывание кальция в кишечнике, реабсорбцию в почках, кишечнике и депонирование в костной ткани. ПТГ регулирует содержание кальция в крови, оказывая влияние на всасывание кальция в кишечнике и почечных канальцах, мобилизацию кальция из костной ткани. Кальцитонин обладает менее значительным влиянием, снижая активность остеокластов, повышает активность остеобластов, приводя к снижению содержания кальция в крови.

Роль ПТГ

ПТГ — полипептид, единственная цепь которого состоит из 84 аминокислотных остатков. Гормон секретируют паращитовидные железы, вероятно, в форме неактивного предшественника, из которого активный гормон образуется путем отщепления полипептидного фрагмента. Активный ПТГ имеет короткий период полужизни, что создает проблемы для анализа: с помощью радиоиммунологического метода измеряют в основном карбокситерминальный фрагмент гормона, который имеет более длительный период полужизни, но биологически неактивен.

При действии на почки ПТГ подавляет реабсорбцию фосфора в проксимальных и дистальных канальцах нефрона, увеличивая его экскрецию и, соответственно, понижая уровень фосфора в крови (гипофосфатемия). Одновременно гормон увеличивает тубулярную реабсорбцию кальция, особенно в дистальных

канальцах нефрона. Действие ПТГ вызывает в костной ткани мобилизацию кальция и фосфата, способствуя возникновению остеопороза и гиперкальциемии. Гипокальциемия по механизму отрицательной обратной связи — основной стимул секреции ПТГ, тогда как гиперкальциемия подавляет образование гормона паращитовидными железами. ПТГ увеличивает также абсорбцию кальция и фосфора в кишечнике, стимулируя синтез 1,25-дигидроксихолекальциферола.

Первичный гиперпаратиреоз

В случаях гиперсекреции ПТГ при аденоме паращитовидной железы развивается выраженный остеопороз, при этом отмечены наличие гиперкальциемии и гипофосфатемии и повышенная экскреция кальция и фосфата с мочой. В этих условиях ингибирована реабсорбция фосфата в канальцах и, следовательно, увеличена его экскреция, повышен клиренс фосфата с возникновением гиперкальциемии в условиях резорбции костной ткани с развитием остеопороза. Подтвердить диагноз можно путем определения концентрации ПТГ в крови. В случаях, когда гипофосфатемия сопровождается гиперкальциемией, диагностически важно даже умеренное повышение содержания гормона.

Следует иметь в виду, что при некоторых формах новообразований легких, почек, яичников происходит эктопическое образование ПТГ клетками опухоли. Среди таких состояний следует дифференцировать форму рахита, резистентную к витамину D. Это редко встречающееся наследственное заболевание, сцепленное с полом, называется синдромом Фанкони. Для последнего характерна высокая экскреция фосфора с мочой одновременно с глюкозурией и аминоацидурией без возникновения ацидоза в крови.

Вторичный гиперпаратиреоз

При хронической почечной недостаточности может происходить активация синтеза ПТГ как компенсаторный механизм при развитии гипокальциемии и гиперфосфатемии. Вторичный гиперпаратиреоз отмечают также при остеомалации, вызванной значительным снижением абсорбции кальция в кишечнике при увеличенной экскреции.

Гипопаратиреоз

Это патологическое состояние развивается чаще всего как осложнение оперативных вмешательств на щитовидной железе, когда по ошибке удаляют паращитовидные железы. В этом случае уровень кальция в крови бывает настолько низким, что развивается специфическая симптоматика гипокальциемии и гиперфосфатемии (симптомы Хвостека и Труссо), экскреция кальция и фосфора с мочой снижается. Такое состояние требует неотложного внутривенного введения хлорида кальция.

Псевдогипопаратиреоз

В клинической картине псевдогипопаратиреоза изменение в крови содержания фосфата и кальция сходно с первичным гипопаратиреозом, но при этом содержание ПТГ в крови повышено. Это состояние характерно для генетического заболевания (болезни Олбрайта), связанного с неспособностью клеток почечных канальцев реагировать на гормон.

Роль кальцитонина

Второй гормон, регулирующий обмен фосфора и кальция, — кальцитонин. Пептид, состоящий из одной цепи, насчитывающий 32 аминокислотных остатка, секретирует парафолликулярные клетки латеральных долей щитовидной железы. Этот гормон ингибирует мобилизацию фосфата и кальция, при этом содержание их в крови понижается (гипокальциемия и гипофосфатемия). Действие гормона на почки недостаточно выяснено; предполагают, что кальцитонин повышает тубулярную экскрецию фосфатов. Кроме того, гормон ингибирует стимулирующее влияние ПТГ на синтез 1,25-дигидроксихолекальциферола.

РОЛЬ ВИТАМИНА D

Третий фактор, активно влияющий на обмен кальция и фосфора в костной ткани, — витамин D. Синтез витамина D в организме проходит в два этапа гидроксилирования: первый происходит в печени с образованием вещества с ограниченной биологической активностью; второй этап происходит в почках с образованием витамина D₃, холекальциферола с максимальной

биологической активностью. В тонкой кишке витамин D₃ стимулирует абсорбцию фосфора и кальция, в проксимальных отделах тубулярной части нефрона активирует реабсорбцию обоих ионов. Факторы, активирующие синтез витамина D₃ в почках, — это снижение содержания фосфора в крови и действие ПТГ.

В условиях дефицита витамина D, обусловленного снижением содержания его жирорастворимых предшественников в пище, недостаточным ультрафиолетовым облучением кожи или мальабсорбцией, в крови отмечают выраженную гипофосфатемию. В ответ на повышение секреции ПТГ увеличиваются абсорбция кальция и фосфата в тонкой кишке и мобилизация минеральных веществ из костной ткани. В течение определенного времени это нормализует содержание кальция в крови, но концентрация фосфора может оставаться сниженной по причине ингибирования его реабсорбции паратиреоидным гормоном.

При хронической почечной недостаточности развивается синдром почечной остеодистрофии — сложное нарушение метаболизма костной ткани и фосфорно-кальциевого гомеостаза. Снижение гломерулярной фильтрации продуцирует гиперфосфатемию, развивается гипокальциемия при снижении в почках синтеза витамина D и резистентности к его эффектам. Гиперфосфатемия может способствовать развитию гипокальциемии вследствие снижения абсорбции кальция в тонкой кишке, обусловленной формированием нерастворимых апатитов.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Собственно метаболические заболевания костей подразделяют на остеопороз, остеопению, остеодистрофию, несовершенный остеогенез и остеопороз. Заболевания костей также могут развиваться на фоне другой патологии, например акромегалии или эктопической кальцификации в стенке сосудов (при атеросклерозе и в норме при образовании «мозгового песка» в эпифизе).

Остеопороз

Остеопороз — наиболее частое метаболическое заболевание костей. Остеопороз типичен для многих заболеваний, характеризуется генерализованной потерей объема костной ткани, превосходящей возрастную и половую норму и приводящей к снижению

прочности кости, что обуславливает подверженность переломам (спонтанным или при минимальной травме). Остеопороз следует отличать от остеопении (обусловленная возрастом атрофия костной ткани) и остеомалации (нарушение минерализации костного матрикса).

К факторам риска остеопороза относят принадлежность к европеоидной или монголоидной расе, семейную предрасположенность, массу тела менее 58 кг, курение и алкоголизм, низкую или чрезмерную физическую активность, раннюю менопаузу, позднее появление менструаций, аменорею и бесплодие, длительную лактацию (более 6 мес), более 3 беременностей и родов в репродуктивном возрасте, а также злоупотребление кофе (более 5 чашек в день), дефицит поступления кальция с пищей и длительное парентеральное питание.

Клиническая картина в большинстве случаев развивается постепенно, обычно в течение нескольких лет. В лабораторной диагностике важны определение уровня ЩФ (может транзиторно повышаться после переломов), кальция и фосфатов (обычно в норме). Активность резорбции кости определяют по отношению уровня кальция мочи к уровню креатинина мочи и по отношению содержания гидроксипролина мочи к уровню креатинина мочи. Рентгенологическое исследование позвоночника выявляет снижение плотности кости с подчеркнутостью кортикальных контуров. Появление на рентгенограмме подобных отклонений возможно лишь при потере не менее 30% костной ткани.

Остеомалация — патология скелета, возникающая при недостаточной минерализации органического матрикса костей. У детей это рахит (см. ниже), у взрослых нарушения метаболизма кальция, фосфора и витамина D.

Рахит — заболевание раннего детского возраста, возникающее вследствие дефицита витамина D, характеризующееся изменениями костной ткани с развитием деформаций скелета. Все патофизиологические процессы обусловлены гипокальциемией в результате недостаточности витамина D и его метаболитов. Компенсаторно происходят активация паращитовидных желез и гиперпродукция ПТГ, мобилизующего выведение кальция из костей и увеличивающего всасывание солей кальция и фосфатов

в кишечнике. Возникают гипофосфатемия, метаболический ацидоз и нарушения остеогенеза.

Остеодистрофии

Деформирующая остеодистрофия (остеит деформирующий, болезнь Педжета) — наследственная болезнь, характеризующаяся деформацией бедренных и большеберцовых костей, позвоночника и черепа с выраженным гиперостозом, утолщением и искривлением костей, повышенной частотой возникновения опухолей. Возникает обычно в возрасте старше 50 лет. Клиническая картина обычно бессимптомна, наиболее частое проявление — боль в кости или суставе. Более редко отмечают костные деформации, головную боль, патологические переломы, повышение температуры тела над пораженной конечностью, сердечную недостаточность с высоким сердечным выбросом и различные неврологические расстройства вследствие сдавления нервной ткани (при поражении черепа наиболее частое из них — глухота). Лабораторно характерно повышение уровня ЩФ и остеокальцина в остеосклеротическую фазу, повышение уровня гидроксипролина в остеолитическую фазу. Содержание кальция и фосфора в сыворотке обычно нормально.

Почечная, или уремическая, остеодистрофия — распространенное повреждение костей, сходное с остеомалацией, рахитом или фиброзным оститом; отмечают при хронической почечной недостаточности.

Наследственная остеодистрофия Олбрайта обусловлена резистентностью клеток-мишеней к действию ПТГ (псевдогипопаратиреоз). Пациенты с псевдогипопаратиреозом проявляют резистентность и к другим гормонам, действующим через аденилатциклазную систему (тиреотропный гормон, глюкагон, ФСГ, ЛГ). У таких пациентов отмечают характерный фенотип, проявляющийся брахидактилией, низкорослостью, подкожными оссификатами. Болезнь Олбрайта часто сочетается с сахарным диабетом, артериальной гипертензией, ожирением, нарушениями менструального цикла (олигоменореей), артериитом, полиартрозом. Также характерны отставание в умственном развитии и судороги (вследствие гипокальциемии).

Несовершенный остеосинтез — наследственное заболевание, вызывающее уменьшение массы костей (вследствие нарушения остеогенеза) и обуславливающее их повышенную ломкость; часто сопровождается голубой окраской склер, аномалиями зубов (несовершенный дентиногенез) и прогрессирующим снижением слуха. УЗИ позволяет выявить тяжелые формы у плода начиная с 16 нед беременности. Возможна диагностика с помощью исследования ДНК в биоптатах ворсин хориона. Лечение симптоматическое и ортопедическое.

Остеопороз и остеосклероз — собирательные и на практике идентичные понятия, характеризующие относительное увеличение содержания костной ткани в составе костей, что приводит к уменьшению объема костномозговых полостей с неизбежным нарушением гемопоэза.

Мраморная болезнь. Известно несколько наследуемых форм: доминантно наследуемая болезнь Альберс–Шенберга и рецессивные — злокачественная, мягкая и летальная формы. Частота всех форм — около 1 : 20 000. Клинически остеопетроз при этой патологии проявляется множественными переломами, остеомиелитом, гиперостозом черепа, хроническим ринитом вследствие сужения носовых ходов, гепатоспленомегалией (вызванной компенсаторным экстрамедуллярным кроветворением), параличом лицевого нерва, анемией (вызванной уменьшением объема костного мозга), а лабораторно — повышением уровня ЩФ.

4.4. МАРКЕРЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА

Не вызывает сомнения тот факт, что рассчитывать на успех лечения заболеваний раком можно лишь при выявлении злокачественных опухолей на раннем этапе развития, однако вопрос о своевременном выявлении признаков такого рода патологий до сих пор остается открытым.

За последние годы диагностические возможности клинических онкологов значительно расширились в связи с использованием современных инструментальных методов диагностики: ангио- и лимфографии, радионуклидной диагностики, компьютерных термо- и рентгенотомографов, радиоманнитного резонанса, УЗИ с использованием доплер-эффекта, которые позволяют

получать цветное изображение опухоли и судить об особенностях микроциркуляции. Современные иммуноморфологические и цитологические исследования позволяют изучать биоптаты не только самой опухоли, но и различных выделений (мокроты, мочи, асцитической жидкости). В настоящее время комплексная лабораторная биохимическая и иммунологическая диагностика строится на определении опухолевых маркеров, гормонов, биологически активных соединений, изоформ ферментов, а также метаболитов костного ремоделирования в случае метастатического поражения костей.

Начало изучения опухолевых маркеров было весьма обнадеживающим. Уже в конце XIX века в моче больных множественной миеломой были обнаружены специфические белки (иммуноглобулины), получившие название «белки Бенс-Джонса», однако следующего успеха пришлось ждать более 80 лет. Он связан с открытием Г.И. Абелевым и Ю.С. Татариновым α -фетопротеина в крови больных гепатомой. Эти исследования положили начало новому этапу в изучении факторов, ассоциированных с ростом злокачественных опухолей и в XX столетии привели к обнаружению серии различных соединений, получивших название «опухолевые маркеры». Маркеры широко используются клиническими биохимиками для выявления первичной опухоли и ее метастазов. К маркерам злокачественного роста относят вещества различной природы. В их число входит более 200 соединений: антигены, гормоны, ферменты, гликопротеины, липиды, белки, метаболиты, концентрация которых коррелирует с массой опухоли, ее пролиферативной активностью, а в некоторых случаях со степенью злокачественности новообразования. Аномальная экспрессия генома — один из основных механизмов продукции маркеров опухолевыми клетками, который обуславливает синтез эмбриональных, плацентарных и эктопических белков, ферментов, антигенов и гормонов.

В качестве идеальных тестов для ранней диагностики злокачественных опухолей предлагалось множество маркеров, однако решения этой проблемы до настоящего времени не найдено. Сложности обусловлены многообразием требований, предъявляемых к идеальному маркеру. Идеальный опухолевый маркер должен продуцироваться опухолевой клеткой в достаточных ко-

личествах, чтобы его можно было определить с помощью современных методов, он не должен присутствовать у здоровых людей и при доброкачественных опухолях, маркер должен выявляться на ранних стадиях опухолевого процесса, количество опухолевого маркера должно быть прямо пропорционально объему опухоли, этот маркер должен определяться еще до клинических проявлений опухоли, уровень идеального маркера должен коррелировать с результатами противоопухолевого лечения.

В клинических исследованиях используется ряд достаточно эффективных опухолевых маркеров, которые, однако, не всегда соответствуют всем вышеуказанным критериям в полной мере. Современные биохимические и иммунологические методы позволяют выявить новообразования, когда условное число опухолевых клеток достигает 10^9 – 10^{10} , а минимальный уровень секретируемого опухолью маркера — от одного до нескольких фемтомолей (все цифры в пересчете на 1 мл сыворотки крови). Большая эффективность использования опухолевых маркеров в клинике может быть достигнута путем комбинации разных тестов. Следует отметить, что количество предлагаемых маркеров для диагностики и мониторинга злокачественных новообразований постоянно увеличивается и наступает этап критической их переоценки с целью формирования стратегии и адекватного использования.

4.4.1. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ

Определение концентрации опухолевых маркеров при различных новообразованиях требует знания факторов как *in vivo*, так и *in vitro*, влияющих на полученные результаты или искажающих их. Это необходимо в равной степени учитывать не только врачам-лаборантам, но и врачам, непосредственно отвечающим за наблюдение и лечебный процесс конкретного больного. Ниже перечислены основные факторы, влияющие на определение опухолевых маркеров.

In vivo:

- степень экспрессии и синтеза маркера;
- высвобождение маркера опухолевыми клетками;
- прием лекарственных и химиотерапевтических препаратов;

- экскреция из организма;
- масса опухоли;
- распространенность опухоли;
- интенсивность кровоснабжения опухоли;
- режим больного;
- положение тела пациента во время забора образца крови;
- ятрогенное воздействие;
- инструментальные и неинструментальные методы обследования (например, бронхоскопия или биопсия);
- катаболизм опухолевого маркера (например, функциональное состояние печени и почек);
- вредные привычки (курение, прием алкоголя).

In vitro:

- условия хранения образцов;
- интервал времени между забором крови и центрифугированием (при отделении сыворотки);
- степень гемолиза и желтушности;
- контакт емкостей для забора образцов крови с кожей;
- загрязнение образца слюной;
- влияние лекарственных препаратов;
- наличие антител к мышинным иммуноглобулинам в крови пациентов (после диагностической иммуносцинтиграфии и иммунотерапии);
- методическая ошибка определения опухолевого маркера.

Необходимо учитывать, что большинство циркулирующих в крови опухолевых маркеров непригодны для скринингового обследования пациентов при отсутствии симптомов, поскольку существует ряд ограничений, связанных с зачастую низкими диагностическими чувствительностью и специфичностью, а также с ограниченностью прогностической ценности. Вместе с тем существует ряд общепризнанных случаев, когда без определения опухолевых маркеров трудно обойтись.

Это, во-первых, оценка эффективности терапии. На ранних этапах изменения концентрации опухолевого маркера могут показать, будет ли успешна выбранная химиотерапия или же (в случае устойчивого роста концентрации) необходима коррекция терапии вплоть до отмены. Конечно, тестирование опухоле-

вого маркера абсолютно не имеет смысла в тяжелых онкологических случаях.

Во-вторых, мониторинг течения заболевания. Использование опухолевых маркеров для мониторинга течения новообразования нередко позволяет обнаружить метастазы и/или рецидив опухоли на 3–5 мес и более раньше клинических проявлений болезни. У некоторых пациентов тестирование опухолевых маркеров после хирургического удаления первичного очага опухоли может обеспечить более чувствительный мониторинг, чем эндоскопия, ультрасонография или компьютерная томография. Скорость возрастания уровня опухолевого маркера обычно позволяет в ряде наблюдений сделать заключение о природе прогрессирования заболевания, в частности о метастазировании. Знание характера изменений уровня опухолевого маркера позволяет также оптимизировать время последующего детального обследования пациента. При сохранении низкого или нормального уровня опухолевого маркера в течение достаточно длительного времени последующее обследование, включающее инвазивные или дорогостоящие методики, представляется излишним. Наоборот, если уровень опухолевых маркеров возрастает, а информация о прогрессировании заболевания необходима при решении вопроса о тактике лечения, такие исследования показаны.

В-третьих, идентификация резидуальных и рецидивных опухолей. Неадекватное слабое снижение уровня опухолевого маркера или отсутствие снижения вообще свидетельствует о неполном удалении опухоли либо о наличии множественных опухолей (метастазов). Информация такого рода может иметь терапевтическую и прогностическую значимость.

И наконец, в-четвертых, прогнозирование течения опухолевого процесса. Это крайне интенсивно развивающаяся современная область применения опухолевых маркеров, в частности таких, исследование которых связано с прогнозом и соответственно в первую очередь влияет на выбор терапии.

4.4.2. КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК

В европейских странах колоректальным раком (КРР) болеет 1 из 20 человек. Реже этот вид рака встречается в Африке

и некоторых частях Азии. Сейчас в России частота выявления КРР монотонно возрастает.

В настоящее время использование молекулярных методов в диагностике КРР считается очень перспективным и важным направлением исследований, это связано с тем, что события, происходящие на уровне генома, следует считать ключевыми в возникновении и прогрессировании этих новообразований. Существует целый ряд достоверных фактов, свидетельствующих о том, что КРР на ранних стадиях развития может и должен идентифицироваться молекулярными методами. Методы молекулярной диагностики КРР позволяют также назначить адекватное лечение и достаточно точно прогнозировать результат.

КРР развивается в результате последовательных изменений (дисплазия/аденома-аденокарцинома), в основе которых лежат генетические нарушения. Однако механизмы, ответственные за возникновение и накопление в эпителиальной клетке таких нарушений, изучены не до конца. Примером трудностей, стоящих на пути изучения этой проблемы, является тот факт, что имеются различия в частоте возникновения доброкачественных и злокачественных фаз болезни, а именно в последовательности дисплазия/аденома-аденокарцинома. Доказано, что колоректальные аденомы возникают более чем у половины населения к 9-му десятилетию жизни, а КРР развивается только у 5% населения. Следовательно, только единичные из предраковых изменений трансформируются в рак.

Так, наряду с пожилым возрастом и хроническими воспалительными заболеваниями (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона или шистосомоз с вовлечением толстой кишки) наличие КРР у кровных родственников — признанный, если не основной, фактор повышенного риска. Причины, которые вызывают развитие КРР у членов одной семьи, могут варьировать от редких аутосомных доминантных синдромов с высокой заболеваемостью КРР (семейный аденоматозный полипоз, синдром наследственного неполипозного КРР) до менее ясных в генетическом отношении состояний, таких, например, как обнаружение аденомы у ближайших кровных родственников (родитель, родной брат или ребенок). Известно, что чем в более молодом возрасте возник КРР, тем выше статистический риск возникновения его

у близких родственников. Наследственные синдромы КРР представлены в табл. 4.6 согласно фенотипу и мутациям в соответствующих генах.

Следует отметить, что изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе редких наследственных синдромов, способствовало пониманию патогенеза спорадического КРР, который наблюдается значительно чаще в популяции, но в основе которого лежат аналогичные или похожие молекулярные события.

Таблица 4.6. Наследственные синдромы КРР

Синдромы	Мутирующий ген
А. Связанные с полипозом	
Семейный аденоматозный полипоз и синдромы с внекишечными проявлениями	APC
Ювенильный полипоз и сопутствующие синдромы	DPC4, PTEN
Синдром Пейтца–Йегерса	STK11
Б. Не связанные с полипозом	
Малая форма семейного аденоматозного полипоза	APC
Мутация I1307K у евреев Ашкенази	hMSH2, hMLH1, hPMS1
Наследственный синдром неполипозного КРР (HNPCC)	hPMS2, hMSH3, hMSH6
Внесиндромные семейные случаи КРР	Неизвестен

Роль молекулярно-генетических нарушений в возникновении КРР и, в частности, нестабильности генома стала интенсивно изучаться относительно недавно. В 1993 г. у членов семей, больных наследственным неполипозным раком толстой кишки (РТК), была найдена нестабильность микросателлитов (MSI). Это открытие послужило основой гипотезы мутаторного фенотипа возникновения рака, выдвинутой Loeb, согласно которой клетка должна пережить целый ряд мутаций, чтобы стать злокачественной. Но для этого она исходно должна иметь способность мутировать чаще, чем в норме, а это в свою очередь может быть связано с инактивацией механизмов, отвечающих в норме за сохранность структуры ДНК.

Таблица 4.7. Виды генетических нарушений и молекулярные маркеры при КРР

Вид нарушения	Гены с первичными нарушениями	Гены с нарушениями во время прогрессирования процесса
Хромосомная нестабильность	APC, β -катенин	Активация RAS, MYC, SRC и т. д.
Нестабильность MSI и нуклеотидов	Гены, исправляющие ошибки ДНК	Инактивация DCC, p53, TGF β и т. д. APC-, TGF β RII, IGFII-рецептор, E2F4, Bax, RAS и т. д.
Аберрантное метилирование	В настоящее время неизвестны	Метилирование промоторных участков с последующей неэффективной транскрипцией APC, p53, p16, hIC1, TSP1, hMLH1 (MSI-зависимый механизм)

Почти во всех случаях РТК отмечается или хромосомная нестабильность, или нестабильность MSI. Фактически между этими двумя нарушениями существует обратная зависимость. Так, злокачественные опухоли, в которых имеется нестабильность MSI, обычно диплоидные и не имеют хромосомных аберраций. Опухоли, в которых имеется хромосомная нестабильность, характеризуются анеуплоидией и часто сопровождаются потерей или появлением добавочных хромосом. Столь частое обнаружение хромосомной нестабильности или нестабильности MSI свидетельствует в данном случае не о том, что это весьма распространенное и неспецифическое явление в процессе возникновения любой злокачественной опухоли, а о том, что нестабильность генома тесно ассоциирована с туморогенезом.

И хромосомная нестабильность, и нестабильность MSI могут быть обнаружены на самых ранних стадиях РТК. Так, используя сравнительную гибридизацию генома для определения среднего числа ошибок при копировании, удалось показать их постепенное увеличение при прогрессировании аденомы с дисплазией легкой степени в аденомы с дисплазией тяжелой степени и последующей трансформацией в рак (табл. 4.8).

У пациентов с наследственной предрасположенностью вследствие нарушений гена APC, включающих нарушения последовательности нуклеотидов и экспрессии гена, возникают опухоли, обычно развивающиеся вследствие хромосомной нестабильности,

Таблица 4.8. Хромосомная нестабильность при возникновении РТК

Область хромосомы	Аденома с дисплазией легкой степени, %	Аденома с дисплазией тяжелой степени, %	Рак, %	MSI, %	Хромосомная нестабильность, %	Первичная опухоль, %	Метастазы, %
7p	7,1↑	33,3↑	50↑	0	33,3↑	10↑	10↑
7q	0	25↑	31,3↑	0	33,3↑	30↑	30↑
12q	0	8,3↑	6,3↑	0	0	20↑	0
13q	0	8,3↑	50↑	16,7↓	41,7↑	30↑ и 10↓	50↑
18q	0	16,7↓	37,5↓	0	25↓	50↓	90↓
20q	0	33,3↑	75↑	0	25↑	50↑	40↑
Число вовлеченных плечей хромосомы	3	21	32	3	22	34	35

Примечание. ↑ с наличием дополнительной аллели; ↓ с потерей аллели.

которая характеризуется потерей аллелей и цитогенетическими нарушениями. Опухоли у части пациентов со спорадической формой КРР возникают таким же путем.

Напротив, у пациентов с синдромом наследственного неполипозного КРР вследствие мутации в гене, исправляющем ошибки ДНК, возникают опухоли, характеризующиеся нестабильностью MSI и нуклеотидов, выявляемых в виде повторяющихся нуклеотидных последовательностей, некоторые из которых располагаются в кодонах генов. Потеря аллелей наблюдается редко. Такой тип молекулярной патологии также наблюдается примерно в 15% случаев спорадических КРР и часто связан с патолого-анатомическими особенностями, такими, как расположение в проксимальных отделах кишки (восходящей ободочной кишке); низкая дифференцировка клеток опухоли с ослизнением, медуллярным или перстневидно-клеточным компонентом; наличие значительного числа лимфоидных фолликулов с зародышевыми центрами по периферии опухоли; инфильтрация опухоли лимфоцитами.

Неэффективная транскрипция генов в результате абберантного метилирования последовательностей цитозин-гуанин (Ц-Г-

островки) в промоторных участках генов в настоящее время рассматривается как один из компонентов молекулярного патогенеза третьего подвида КРР.

Использование методов молекулярной диагностики у пациентов имеет большой потенциал как в ранней диагностике и оценке ответа опухоли на терапию, так и в прогнозе заболевания. Как показано в табл. 4.9, при такой диагностике можно использовать различные объекты исследования.

У тех пациентов, у которых уже имеется КРР, молекулярные методы могут быть использованы для идентификации микрометастазов, для более точной оценки стадии опухолевого процесса, в частности выявления микрометастазов в лимфатических узлах, или для оценки возможной гематогенной диссеминации опухолевых клеток в костный мозг.

Таблица 4.9. Использование методов молекулярной диагностики при КРР

А. Исследование ткани опухоли	
Карциномы	
Прогноз/течение заболевания	
Уточнение стадии опухолевого процесса	
Обнаружение микрометастазов	
Установление генотипа и фенотипа метастазов	
Прогноз ответа на терапию	
Аденомы	
Развитие метакхронных опухолей	
Исследование неопухолевых тканей	
Б. Исследование проб крови и кала	
Диагностика микрометастазов и оценка гематогенной диссеминации	
Диагностика, скрининг и динамическое наблюдение	
Диагностика наследственных синдромов (см. табл. 4.6)	

Кроме того, молекулярная диагностика обладает большим потенциалом для выявления генотипических и фенотипических характеристик опухоли, которые обуславливают целую цепь событий, приводящих к метастазированию клеток, — так называемый метастатический генотип и фенотип. Маркеры этого типа могли бы указывать на большую вероятность прогрессирования опухолевого процесса после радикальной операции.

Генетические нарушения, связь которых с прогнозом или ответом на химиотерапию КРР была установлена, включают

потери аллелей в 18q, исчезновение экспрессии продукта гена DCC, нарушения в гене p53, потерю аллелей на коротком плече хромосомы 1 и 5, RAS-мутации. Исследования клинической эффективности использования таких молекулярных маркеров были убедительно сформулированы, в настоящее время проводятся и включают в себя репрезентативную популяционную выборку. Для широкого использования в клинической практике исследования молекулярных маркеров должны удовлетворять всем требованиям, предъявляемым к рутинным лабораторным тестам, таким, как воспроизводимость, доступность, адекватный контроль качества. Наконец, результаты исследования молекулярных маркеров должны легко интерпретироваться клиницистами и иметь терапевтическое значение.

Сложность и многоступенчатость генетических и биохимических процессов, протекающих в раковых клетках, которые позволяют им метастазировать, обуславливают трудность интерпретации значений таких маркеров. Кроме того, факторы, не связанные с опухолью непосредственно, например качество хирургической техники, значительно влияют на конечный результат. Среди маркерных генов опухоли, прогнозирующих терапевтический ответ, внимание было сосредоточено на p53 и генах, ответственных за апоптоз, которые регулируются p53.

Одной из областей молекулярно-генетического изучения опухолей является выявление молекулярных нарушений, характерных для более позднего развития метакронных опухолей, иногда ошибочно рассматриваемых как рецидив основной опухоли. Такие исследования включают изучение колоректальных аденом в качестве мишени для идентификации маркерного гена из-за их высокой частоты в популяции как предракового изменения по сравнению с низкой частотой выявления злокачественных опухолей. Молекулярный маркер, указывающий на высокую вероятность развития метакронных аденом, особенно аденом, способных трансформироваться в злокачественную опухоль, мог бы быть полезен для определения групп риска с целью последующего колоноскопического скрининга.

Напротив, тех пациентов, у которых метакронные аденомы вряд ли будут прогрессировать, можно исключить из скрининга. Стратегия удаления аденом показала, что она связана с уменьше-

нием частоты КРР и молекулярные маркеры, идентифицирующие пациентов с более высоким риском, могли бы быть полезны.

Исследование проб кала и крови имеет так же большой потенциал. Так, использование весьма простого теста на скрытую кровь в кале позволило снизить смертность от КРР, однако его специфичность остается относительно низкой. Молекулярные тесты на обнаружение в кале фрагментов опухолевой ДНК являются более прогрессивными. Целый ряд исследований показал, что ДНК, содержащая мутации, может быть идентифицирована в кале и крови пациентов, у которых имеются опухоли с этими мутациями. Диагностика опухолей, скрининг и динамическое наблюдение за больными могут существенно улучшиться, если будут преодолены определенные технические трудности и сбалансированы затраты на их проведение.

В настоящее время большое внимание исследователи уделяют изучению перспектив использования молекулярно-генетических маркеров КРР. Ниже дается краткая характеристика опухолевых маркеров, которые уже сейчас наиболее часто используются в клинической практике.

Раково-эмбриональный антиген

Впервые раково-эмбриональный антиген (РЭА) обнаружили в 1965 г. Gold и Freedman при исследовании тканей желудочно-кишечного тракта человека и аденокарциномы толстой кишки. Позже РЭА был выявлен в сыворотке крови больных КРР. Эти первые работы были весьма обнадеживающими. Тогда многим казалось, что найден высокоспецифический тест для диагностики РТК. Однако в последующем по мере совершенствования методов обнаружения РЭА и накопления клинических данных этот маркер удалось выделить и при других опухолях (раке поджелудочной железы, печени, легкого, щитовидной железы и нейробластоме), а также при неопухолевых заболеваниях (циррозах печени, язвенных колитах, панкреатитах, хронических бронхитах, эмфиземе, вирусном гепатите, дивертикулите, полипах, почечной недостаточности). Поэтому нельзя при выявлении РЭА абсолютно точно утверждать, что у больного данный тип рака. Вместе с тем до сих пор РЭА остается маркером первого

выбора при КРР и используется с высокой эффективностью в мониторинге заболевания, но главное внимание при этом уделяют количественным параметрам метода.

У 99% здоровых людей уровень РЭА равен менее 5 нг/мл. При КРР чувствительность теста колеблется от 25 до 80% и зависит от размеров и степени дифференцировки опухоли, а также распространенности процесса. Уровень РЭА коррелирует со стадией опухолевого процесса. Так, по суммированным данным разных авторов в соответствии со стадиями по классификации Dukes для антигена было характерно нарастание его концентрации: при стадии А — 7,8 нг/мл, В — 30,3 нг/мл, С — 58,1 нг/мл, D — 134,3 нг/мл. При этом частота выявления РЭА (при пороговом значении маркера 5 нг/мл) в группах больных с указанными стадиями нарастала и соответствовала 3, 25, 45 и 65%, а при пороговом значении маркера > 2,5 нг/мл обнаруживалась еще чаще при вышеуказанных Dukes-стадиях и соответствовала 28, 45, 75 и 84%. С учетом того что при стадии А и В опухолевый маркер повышен только у 3–28% больных, его использование в ранней диагностике КРР проблематично. Высокодифференцированные опухоли активнее продуцируют РЭА.

По данным многих авторов, маркер обладает прогностической значимостью, которая заключается в том, что высокий исходный уровень РЭА в сыворотке крови (более 25 нг/мл) свидетельствует о высоком риске развития раннего рецидива КРР после хирургического удаления опухоли.

Одним из примеров использования РЭА является определение радикальности хирургического вмешательства при КРР. Как правило, после радикального хирургического удаления опухоли уже к концу 6-й недели концентрация антигена становится ниже нормы. Если уровень маркера не падает после удаления первичной опухоли, следует думать, что у больного есть метастазы. Рекомендуются определять РЭА у больных в послеоперационном периоде через 3 мес на протяжении 2 лет. Регулярный мониторинг больных КРР с включением определения РЭА улучшает показатели 5-летней выживаемости. Адъювантная химиотерапия (5-фторурацил и левамизол) у больных КРР может вызывать преходящее повышение уровня РЭА в сыворотке крови. Не рекомендуется рутинно определять РЭА в мониторинге ответа на

терапию, однако никаких альтернативных тестов в оценке ответа на лечение у больных КРР пока нет.

У большинства больных РТК (79,1%) по сравнению с группой контроля (10%) обнаружены IgM- и IgG-антитела к РЭА, что также позволяет использовать этот показатель как диагностический маркер и независимый фактор прогноза. При этом выявление антител к РЭА в сыворотке крови больных КРР ассоциируется с лучшим прогнозом и значительным увеличением показателя 2-летней выживаемости.

Анализ уровня РЭА в смывах толстой кишки до проведения рутинного эндоскопического исследования показал, что этот простой тест может быть полезным в практической медицине для выявления группы пациентов с высоким риском развития КРР.

Применение РЭА в диагностических целях ограничено его низкой специфичностью, обусловленной повышением концентрации антигена в сыворотке крови при неопухолевых заболеваниях, а также влиянием на синтез этого маркера некоторых экзогенных и эндогенных факторов. Поэтому при обследовании больных с опухолями толстой кишки в качестве маркера второго выбора используют СА-19-9 (см. ниже). Особое значение это имеет при РЭА-негативных новообразованиях.

Учитывая низкую чувствительность и специфичность, также не рекомендуется использовать определение РЭА в скрининге КРР. В случае 5-кратного повышения РЭА в сыворотке крови и наличия клинических жалоб у больного следует предполагать КРР.

СА-19-9 и α -фетопротейн

Сравнительный анализ 3 опухолевых маркеров (СА-19-9, РЭА и α -фетопротейна) в сыворотке крови больных РТК при различных стадиях опухолевого процесса, у больных хроническим язвенным колитом и у практически здоровых людей выявил достоверное различие между больными локализованным РТК и хроническим язвенным колитом по уровню СА-19-9 и РЭА, а также между локализованным и генерализованным РТК по двум вышеуказанным опухолевым маркерам. Значения опухолевых маркеров при хроническом язвенном колите не превышали

таковые в норме. При локализованном процессе уровень СА-19-9 не превышает 1000 ед/мл, РЭА — 20 нг/мл. Показатели α -фето-протеина у больных КРР находятся в пределах нормы и повышаются, как правило, только при генерализации опухолевого процесса, что не позволяет использовать этот маркер в диагностике заболевания. При использовании комплекса СА-19-9+РЭА диагностическая чувствительность составляет 91% и значительно превышает таковую при использовании только одного опухолевого маркера. Присоединение к инструментальным методам диагностики данных по определению опухолевых маркеров (СА-19-9 и РЭА) повышает частоту выявления локализованного КРР на 14%, а при генерализации процесса — на 9%.

Маркеры апоптоза

Для опухолей характерен дисбаланс между процессами пролиферации и апоптоза. Эндотелин-1 — полипептид из 21 аминокислотного остатка — обладает вазоконстрикторной и митогенной активностью, а также вовлечен в механизмы регуляции апоптоза. В эксперименте показано, что эндотелин-1 является фактором выживания и способен *in vitro* защищать клетки РТК от FasL-индуцированного апоптоза.

Частота выявления и уровень растворимого Fas-антигена (sFas) — ингибитора апоптоза — в сыворотке крови больных РТК выше, чем у практически здоровых людей. Отмечена тенденция к повышению содержания sFas в сыворотке крови больных РТК с метастазами в регионарных лимфатических узлах и печени, что позволяет обсуждать роль Fas/FasL-системы как возможную мишень противоопухолевой терапии у больных КРР.

Показано, что высокая активность каспазы-3 коррелирует с высоким риском рецидива РТК, особенно в случаях правосторонней его локализации. Также выявлена корреляция активности каспазы-3 с CD57+ опухолинфильтрирующими клетками.

Важную роль в механизмах регуляции апоптоза при РТК играет bcl-2, который экспрессируется в норме клетками, выстилающими донную часть крипт толстой кишки. Показано, что экспрессия bcl-2 при РТК Dukes B-стадии ассоциируется с лучшей выживаемостью больных и соответственно пациентам,

у которых опухоли не экспрессируют bcl-2, целесообразно проводить адьювантную терапию.

Экспрессия иммунореактивного p53 в первичной опухоли при КРР является маркером высокого риска рецидива заболевания после хирургического ее удаления и чаще после 1-го года наблюдения. При этом повышенная экспрессия p53 выявлялась в 47, а РЭА — в 34,4% опухолей. Полагают, что при оценке прогноза КРР необходимо определение обоих маркеров.

Известно, что генетические повреждения отличают первичные карциномы проксимального и дистального отделов толстой кишки. Так, многофакторный анализ экспрессии p53 в первичных КРР чаще выявляет повышенную экспрессию p53 в дистальных (58,5%), чем проксимальных (41,7%) РТК. При этом безрецидивный период меньше в p53+ опухолях (75 и 38%; соответственно $p=0,006$). Высокий риск рецидива КРР отмечен среди p53+ опухолей при их дистальной локализации. Следовательно, оценка экспрессии p53 при КРР может служить маркером раннего рецидива заболевания и связана с локализацией опухоли в органе.

Доказано, что неудачи химиотерапии КРР связаны с множественной лекарственной резистентностью этих новообразований. Показано, что экспрессия различных изоформ CD44 ассоциируется с агрессивным поведением опухоли и ставит вопрос о том, модулирует ли сигнал от этого рецептора лекарственную чувствительность опухоли. Также доказано, что CD44 индуцирует активацию src-семейства тирозинкиназы LYN и Akt. Способность супрессировать апоптоз может играть решающую роль в развитии опухолей толстой кишки, что связано с экспрессией CD44.

Активаторы и ингибиторы системы плазминогена

В последние годы пристальное внимание исследователей привлекает изучение металлопротеиназ внеклеточного матрикса, которые тесно связаны с процессами инвазии и метастазирования опухолей. При развитии метастазов должна иметь место цепь последовательных событий, приводящих к выходу опухолевых клеток из их первоначального окружения и образованию опухолевых узлов в отдаленных органах и тканях. Предполагается, что

для обеспечения процессов инвазии и метастазирования нужна комплексная протеолитическая цепочка, включающая различные протеазы. Считается, что плазмин, уменьшающий уровень внеклеточных матричных гликопротеидов и активирующий некоторые про-металлопротеазы, играет решающую роль в процессах инвазии и метастазирования, при этом в многоступенчатой цепочке протеаз ключевую позицию занимает сериновая протеаза — активатор плазминогена урокиназного типа (uPA), поскольку она катализирует образование плазмина из его предшественника плазминогена. Важную роль играет также рецептор uPA (Рц-uPA), так как при связывании uPA с рецептором его способность активировать плазминоген увеличивается. С другой стороны, в тканях РТК могут присутствовать ингибиторы uPA — PAI-1 и PAI-2. Показано, что уровень uPA и PAI-1 в КРР выше, чем в гомологичной нормальной ткани и доброкачественных опухолях.

Вопрос о том, является ли uPA при РТК у человека производным самих раковых клеток или элементов окружающей стромы (фибробласты, макрофаги, лейкоциты), долгое время оставался без ответа. В конце концов Harvey и соавт. удалось доказать, что активатор происходит из самих раковых клеток, а не заимствуется ими из элементов стромы, при этом антиген наиболее интенсивно выявляется в апикальной и базальной областях клеток РТК.

Наиболее репрезентативное исследование компонентов системы активации плазминогена в образцах КРР было проведено Fujii и соавт., они анализировали также экспрессию генов uPA и PAI-1 с использованием метода ПЦР. Экспрессия uPA была обнаружена в 58,8% опухолей. У пациентов с положительными результатами теста на uPA и отрицательными результатами на PAI-1 прогноз 5-летней выживаемости был достоверно хуже. Многофакторный анализ показал, что результаты одновременного определения uPA и PAI-1 в КРР являются независимыми прогностическими показателями.

Выживаемость больных после операций не коррелировала с содержанием uPA в строме опухоли, однако была отмечена закономерность, связанная с его уровнем в эпителии опухоли, т.е. определение уровня uPA вполне может быть тестом для

диагностики РТК еще без метастазов, а также риска раннего развития рецидива после операции. Возможно, что протеазы могут быть мишенью лекарственных препаратов, предотвращающих инвазию и метастазирование КРР.

Метастазы в печень — важный фактор, ограничивающий прогноз у больных РТК. Существует корреляционная связь между *uPA* и печеночными метастазами. Трансдукция гена *tPA* в клетки РТК может быть полезна с точки зрения противодействия печеночным метастазам.

Наименее изученным в клиническом плане компонентом системы активации плазминогена считается Рц-*uPA*, который представляет собой мембранно-связанный трехдоменный гликопептид. Этот рецептор может также существовать в растворимой форме (рРц-*uPA*) в экстрактах из опухоли, а также в плазме крови как здоровых людей, так и больных раком. Растворимый Рц-*uPA* в плазме является практически неизменной молекулой, однако ни точный механизм его высвобождения с поверхности клеток, ни его биологическая функция до конца не изучены. Повышенный уровень рРц-*uPA* в плазме крови был обнаружен у больных РТК, а концентрация рРц-*uPA* связана с прогнозом заболевания. Возможно, что Рц-*uPA* могут вносить весомый вклад в усиление ангиогенеза вокруг опухоли, равно как и в процессы метастазирования по микрососудам.

Таким образом, повышенная экспрессия Рц-*uPA*, характеризующая инвазивную способность опухоли *in vitro* по крайней мере в некоторых субпопуляциях клеток РТК, является частично следствием постоянной активации сигнального каскада, зависящего от митогенактивированных протеинкиназ.

Рецепторы факторов роста

Одной из важных регуляторных систем передачи митогенного сигнала является семейство тирозинкиназных рецепторов — продуктов онкогенов группы *c-erbB*, в которое входят 4 сходных по структуре трансмембранных рецептора — рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР или ErbB1), а также ErbB2 (HER2/*neu*), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4). Помимо структуры, эти рецепторы различаются между собой по относительной

специфичности и сродству к различным общим лигандам. После активации в результате связывания лигандов и димеризации внутренняя тирозинкиназа рецепторов активируется и приобретает способность фосфорилировать как сам рецептор, так и другие клеточные белки, участвующие в передаче митогенного сигнала.

В аутокринной и паракринной регуляции пролиферации клеток КРР участвуют различные ростовые факторы. В последние годы активно изучается клиническое значение рецепторов факторов роста и их лигандов при КРР, в первую очередь РЭФР, рецептора инсулиноподобного фактора роста типа 1 (РИФР-1), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (R-VEGF).

РЭФР — продукт онкогена *c-erbB1*, представляющий собой трансмембранную тирозинкиназу, — наиболее изученный в клиническом плане маркер данной группы при опухолях различной локализации, но недостаточно исследованный при КРР.

Рецепторы семейства *ErbB* могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, при этом во многих случаях наиболее активными являются гетероструктуры с участием второго представителя этого семейства — *HER2/neu*, не имеющего собственного лиганда. Таким образом, *HER2/neu* является ключевым звеном передачи митогенных сигналов ЭФР-подобных факторов роста и его блокирование может существенно замедлить или остановить рост опухолей, зависящих от подобных стимулов. Полагают, что повышенная экспрессия *HER2/neu* в опухолях, в том числе и при КРР, может служить маркером чувствительности и мишенью для более эффективной биотерапии этих новообразований. Клинические исследования продолжаются, и в литературе представлены предварительные работы, посвященные изучению экспрессии *HER2/neu* в прогнозе опухолей ЖКТ.

РИФР-1 и РИФР-2 являются потенциальными митогенами и сильными стимуляторами роста опухолевых клеток. Ростостимулирующие эффекты обоих типов РИФР опосредуются, главным образом РИФР-1. Единого мнения относительно клинической ценности РИФР-1 при КРР до настоящего времени не существует.

В большинстве исследований показана обратная взаимосвязь между обнаружением рецепторов стероидных гормонов (эндо-

кринный тип регуляции) и РЭФР (ауто- и паракринный тип регуляции) в опухолях.

Блокирование любого из этапов передачи митогенного сигнала факторов роста может в принципе привести к нарушению регуляции пролиферации опухолевых клеток и потенциально к торможению роста опухоли. В эксперименте уже исследовано достаточно большое количество препаратов, влияющих на вышеперечисленные процессы: специфические и неспецифические блокаторы связывания РЭФР с лигандами, ингибиторы тирозинкиназы и других киназ, блокаторы связывания SH2-доменов эффекторных белков с активированным рецептором, соединения, подавляющие активацию гена *ras*, в том числе ингибиторы фарнезилирования. Большинство из них находятся на стадии клинического изучения, хотя некоторые, в частности, герцептин, уже прошли клинические испытания и показали себя достаточно эффективными при некоторых видах опухолей.

Известно, что РТК являются тканями-мишенями стероидных гормонов и в 25–60% случаев сохраняют функциональную способность первичного звена механизма действия одного или нескольких стероидов, а именно рецепторы эстрогенов (РЭ; 40,9%), андрогенов (РА; 15,5%), прогестерона (РП; 32,6%) и глюкокортикоидов (РГ; 59,1%). Однако только наличие РЭ и РП в опухоли может быть использовано как критерий благоприятного прогноза 10-летней выживаемости больных КРР. При этом чаще РЭ выявляются в РТК у женщин (60,5%), чем у мужчин (39,5%), при локализованной стадии заболевания (63,1%) и поражении опухолью правых отделов толстой кишки (59,4%).

Опухолевые маркеры ангиогенеза

Большой интерес исследователи проявляют в последние годы к изучению ангиогенных факторов в опухоли и в частности к VEGF. Появляется все больше доказательств, что метастазирование на разных этапах опухолевого процесса зависит от степени васкуляризации опухоли.

При гематогенном метастазировании клетки опухоли должны прикрепиться к эндотелиальным клеткам, пройти в про-

свет сосуда, выжить в циркулирующей крови, остановиться в определенном органе или ткани и образовать там колонию. Высокоангиогенные первичные опухоли, к которым относится и КРР, с высокой внутриопухолевой плотностью сосудов с большой вероятностью могут дать в отдаленном органе ангиогенный клон, который при благоприятных условиях способен образовать метастаз. Большинство исследователей полагают, что высокая степень васкуляризации опухоли является статистически значимым маркером наличия метастазов в регионарных лимфатических узлах. В 77% ранее проведенных исследований обнаружена значимая связь между опухолевым ангиогенезом и развитием отдаленных метастазов. И хотя имеются значительные различия в исследованных группах пациентов и используемых методах оценки ангиогенеза, большинство исследователей продемонстрировали обратную связь между васкуляризацией опухоли и выживаемостью больных КРР. Кроме того, недостаточная васкуляризация и как следствие ее гипоксия увеличивают экспрессию генов, связанных с устойчивостью (Pg-гликопротеина, гидрофолатредуктазы) к химиотерапии и представляют важный фактор неэффективности неoadъювантной лучевой и химиотерапии.

У большинства больных (73,4%) с регионарными метастазами в лимфатических узлах безрецидивный период достоверно выше при отсутствии экспрессии VEGF и низком индексе SPF (S-phase fraction) в опухоли. В дополнение к прогностической значимости VEGF показано, что блокирование VEGF-рецептора-2 ингибирует рост метастазов КРР в печени.

В настоящее время ангиогенной активностью обладают более 200 соединений, и по ингибирующему действию все они могут быть разделены на две группы. В первую входят соединения, влияющие на передачу ангиогенных сигналов эндотелиальными клетками (антагонисты факторов роста эндотелия, ингибиторы продукции ангиогенных факторов, миграции эндотелиальных клеток), а во вторую — соединения, влияющие на пролиферацию эндотелиальных клеток. Наиболее перспективны такие антиангиогенные препараты, как маримастат, батимастат — ингибиторы матриксных металлопротеиназ, SU 6661.

Следует отметить, что за последние годы наши знания о биологических процессах, вовлеченных в формирование новых микрососудов в опухоли, значительно расширились. И хотя прогностические и терапевтические принципы еще только формируются, достижения в понимании патофизиологических механизмов неоангиогенеза в опухоли уже внедряются в клиническую практику.

Ферменты

Одним из наиболее эффективных маркеров лекарственной резистентности и прогноза КРР считается уровень экспрессии тимидилатсинтетазы в опухоли. Фермент необходим для синтеза ДНК и катализирует метилирование дезоксиуридинмонофосфата в дезокситимидинмонофосфат в качестве кофактора 5,10-метилентетрагидрофолата (5,10-CH₂FH₄). Известно, что 5-фторурацил (5-ФУ), один из наиболее широко используемых антиметаболитов в лечении гастроинтестинальных опухолей, при введении больному образует 5-фтор-2'-дезоксиуридин-5'-монофосфатные формы, связывающиеся ковалентно с тимидилатсинтетазой, блокируя, таким образом, процесс синтеза ДНК в опухоли. Изучение показателей экспрессии тимидилатсинтетазы в опухолях больных КРР позволило считать его независимым фактором прогноза у данной категории больных. При этом показатели 10-летней выживаемости были достоверно ниже среди пациентов, в опухоли которых выявлена экспрессия фермента.

На основании ретроспективного многофакторного анализа и высокой степени достоверности результатов по определению в опухолях экспрессии тимидилатсинтетазы считают, что этот маркер может быть использован в клинике как независимый фактор прогноза локального рецидива, отдаленных метастазов, длительности безрецидивного периода и общей выживаемости больных РТК. Лучший прогноз имели больные ТРК с низкой экспрессией тимидилатсинтетазы в первичной опухоли. При этом исследователи убедительно продемонстрировали, что никакие другие факторы прогноза, в том числе возраст, пол, степень дифференцировки опухоли, экспрессия p53 не могут считаться независимыми маркерами прогноза, в частности, рецидива этого заболевания.

Уровень экспрессии тимидилатсинтетазы при генерализованном или рецидивирующем КРР может быть маркером чувствительности опухоли к 5-ФУ. Чаще наиболее высокие показатели экспрессии фермента обнаруживались в абдоминальных метастазах КРР (82%) по сравнению с метастазами опухоли в печени (47%). Полагают, что это необходимо принимать во внимание при прогнозе чувствительности диссеминированных форм опухоли к 5-ФУ и индивидуально изменять стратегию химиотерапии у пациентов.

Также показано, что экспрессия тимидилатсинтетазы и тимидинфосфорилазы в опухолях нелеченых больных КРР не только имеет прогностическое значение в выборе химиотерапии 5-ФУ вместе с такими маркерами пролиферации, как p53 и Ki-67, но и коррелирует с показателями безрецидивной и общей выживаемости. При этом активность 2 указанных ферментов изучали биохимическим методом в свежемороженых образцах опухоли и сравнивали их экспрессию с помощью иммуногистохимического метода в парафиновых срезах вместе с p53 и Ki-67. Выявлена также значимая корреляционная связь между показателем ферментативной активности тимидинфосфорилазы и связывающей активностью 5-фтор-2'-дезоксинуридин-5'-монофосфата (метаболит 5-ФУ). Стало известно, что с процессами ангиогенеза и пролиферации при КРР имеют тесную связь активность тимидилатсинтетазы и тимидинфосфорилазы. При этом экспрессия VEGF значительно коррелировала с активностью тимидинфосфорилазы и индексом Ki-67 в опухоли, а также длительностью безрецидивного периода.

При изучении дигидропиримидиндегидрогеназы — первого фермента, который метаболизирует 5-ФУ в 5-фтордигидроурацил, обнаружено, что показатель экспрессии этого фермента в опухоли может быть использован как маркер в оценке чувствительности КРР к 5-ФУ.

Высокая активность индуцированной синтетазы оксида азота может служить маркером более агрессивного течения КРР.

Предложено использовать высокочувствительный и специфичный метод определения теломеразной активности в эпителиальных клетках КРР, циркулирующих в крови. Активность фермента выявлена в 72% опухолей при стадиях C и D (клас-

сификация Dukes) KPP. Полагают, что данный маркер в этом малоинвазивном методе может быть использован в ранней диагностике, прогнозе и мониторинге больных РТК.

Обнаружено, что повышенная экспрессия CDC25B-фосфатазы в клетках KPP в 43% случаев указывает на плохой прогноз заболевания. Поэтому эти пациенты нуждаются в адъювантной терапии. Полагают, что CDC25B может служить независимым прогностическим маркером и даже контролировать такие факторы, как метастазы в регионарных лимфатических узлах, диаметр первичной опухоли, степень ее дифференцировки, глубину инвазии. Более того, уровень экспрессии CDC25B убедительно указывает на возможный ранний рецидив KPP стадий B и C по Dukes.

В последнее время появились работы, свидетельствующие о возможности использования фермента синтеза простагландинов и эйкозаноидов — циклооксигеназы-2 (COX-2), известной также как простагландинэндопероксидсинтетаза, — в качестве маркера ранней диагностики и прогноза KPP. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о важной роли COX-2 в патогенезе KPP. Показаны отсутствие COX-2 в эпителии нормальной слизистой оболочки и экспрессия белка в 40% полипов и 80–90% злокачественных опухолей толстой кишки, что является подтверждением участия COX-2 в неопластических процессах и в прогрессии KPP. Установлена положительная корреляция между экспрессией COX-2 и размером, стадией опухоли по классификации Dukes. Увеличение экспрессии COX-2 в РТК стало основой для попыток использования ее ингибиторов, в частности нестероидных противовоспалительных препаратов, в качестве профилактических средств, предотвращающих развитие KPP и малигнизацию полипов толстой кишки. В экспериментах на животных было показано, что ингибиторы COX-2 проявляют защитное действие при колоректальном канцерогенезе. Кроме того, эти препараты предотвращали образование новых полипов и способствовали регрессии уже существующих в толстой кишке. С другой стороны, данные некоторых экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что противоопухолевое действие нестероидных противовоспалительных препаратов связано также с тем, что они индуцируют апоптоз

в клетках РТК и ингибируют ангиогенез в экспериментальных опухолях.

Другие маркеры КРР

Вкратце остановимся на некоторых опухолевых маркерах, применение которых представляется перспективным при КРР.

Уровень экспрессии MUC1 в опухолях может быть использован как маркер в оценке прогрессирования и прогноза КРР.

Циклинзависимый ингибитор киназы P27 (KIP1) может быть использован как маркер выявления ранних стадий КРР. Однако он не может быть использован в качестве маркера раннего прогрессирования этих новообразований.

Также совсем недавно предложено использовать при оценке распространенности РТК новый маркер — ТА90-IC, который присутствует в сыворотке крови в форме циркулирующих иммунных комплексов. Основанием для проведения исследования послужил тот факт, что, по данным многих авторов, уровень РЭА повышен только у 70% больных в распространенной стадии болезни. У 86% обследованных больных были выявлены отдаленные метастазы, хотя многие из этих пациентов клинически имели локализованную опухоль без признаков генерализации опухолевого процесса. Анализ уровня вышеуказанных маркеров показал, что концентрация ТА90-IC была увеличена у 82,9%, а РЭА — только у 70,2% больных. Комбинация обоих маркеров позволила установить распространенность опухолевого процесса в 93,5% наблюдений. Исследователи считают, что данную работу необходимо продолжить и доказать роль ТА90-IC в скрининге и мониторинге прогрессирования КРР.

Необходимо отметить, что наиболее адекватным с клинической точки зрения может быть одновременное определение только небольшого числа взаимодополняющих показателей, способных охарактеризовать пролиферативную активность КРР, ее метастатический потенциал, чувствительность к различным типам центральной и локальной регуляции. Задачей исследователей, работающих в данной области, является выбор оптимального в количественном и качественном отношении сочетания молекулярных маркеров в диагностике, мониторинге и прогнозе КРР.

4.4.3. РАКОВЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЖЕЛУДКА, ПИЩЕВОДА И ПЕЧЕНИ

Поджелудочная железа

В Западной Европе рак поджелудочной железы выявляется приблизительно в 10 случаев на 100 000. Около 90% всех опухолей поджелудочной железы составляют аденокарциномы из протоков и только 5% — нейроэндокринные новообразования и ацинарный рак.

Наиболее широко в диагностике рака поджелудочной железы используется маркер СА 19–9. Специфичность его определения варьирует от 76 до 99%, а чувствительность — от 69 до 93%. Однако повышенная концентрация СА 19–9 в сыворотке крови не является специфичной только для аденокарцином поджелудочной железы. Высокий уровень СА 19–9 обнаружен при других заболеваниях ЖКТ (остром и хроническом панкреатите, циррозе печени, воспалении желчных протоков).

Показано, что только 55% больных раком поджелудочной железы при диаметре опухоли менее 3 см имеют повышенный уровень СА 19–9 (> 37 U/ml). Следовательно, использование маркера СА 19–9 в диагностике рака поджелудочной железы, в частности ранних его форм, ограничено, поскольку уровень его повышается и при вышеперечисленных доброкачественных процессах в печени и поджелудочной железе. Рекомендуется определение показателей СА 19–9 для оценки прогноза рака поджелудочной железы, но не для рутинной практики.

В перспективных исследованиях изучается также ряд других маркеров при раке поджелудочной железы: муцины типа СА50, СА242, СА195, DU-PAN 2, САМ 17.1/WGA. Однако в настоящее время СА 19–9 следует считать «золотым стандартом» в диагностике рака поджелудочной железы.

Желудок

Рак желудка — одна из наиболее распространенных форм опухоли в мире. В Западной Европе частота его в последнее десятилетие снизилась, тогда как в Азии показатель смертности вырос и приблизительно равен 100 на 100 000. В США от рака желудка умирает ежегодно 6 больных на 100 000.

Достаточно подробно изучаются при раке желудка три маркера: РЭА, СА 19-9 и СА 72-4, однако наиболее чувствительным и специфичным считается СА 72-4. РЭА и СА 19-9 обладают одинаковой специфичностью, хотя СА 19-9 может быть более чувствительным, чем РЭА, однако ни один из вышеуказанных маркеров не может быть использован в скрининге и ранней диагностике рака желудка.

Рак пищевода

Частота выявления рака пищевода значительно варьирует. Так, в Центральной Азии заболеваемость им составляет 50–100 случаев на 100 000, тогда как в Европе и США — 2–3 случая на 100 000. В 90% рак пищевода представлен плоскоклеточной карциномой и менее чем в 10% — аденокарциномой.

По сравнению с другими опухолями ЖКТ биохимические маркеры рака пищевода исследовались недостаточно. Однако считается, что наилучшими маркерами в диагностике рака пищевода из плоскоклеточного эпителия следует считать SCC и цитокератины (CYFRA 21-1, TPA, TPS), тогда как предпочтение при диагностике аденокарцином пищевода отдают СА 19-9. Вместе с тем опухолевым маркерам в диагностике опухолей пищевода уделяется незначительное внимание ввиду их неспецифичности.

Гепатоцеллюлярная карцинома

Другое название этого заболевания — «злокачественная гепатома». Такой диагноз ставится в Западной Европе с частотой 5–10 случаев на 100 000, а в Южной Европе — менее 5 случаев на 100 000. Наиболее часто рак печени выявляется в Китае, где рекомендуется популяционный скрининг эндемического очага этого вида опухоли с целью выявления новообразования.

Основным маркером в диагностике гепатоцеллюлярной карциномы является α -фетопротейн, который при скрининге позволяет выявить опухоли небольшого размера, что способствует увеличению послеоперационной выживаемости у этой категории больных. Однако следует заметить, что роль α -ФП в скрининге гепатоцеллюлярной аденокарциномы не определена проспективными рандомизированными исследованиями. Ввиду очень редко-

го выявления этих новообразований в Западной Европе полагают, что проведения скрининга гепатоцеллюлярной карциномы не требуется. Однако с 1986 г. рекомендуются проведение каждые 6 мес ультразвукографии печени и определение каждые 3 мес концентрации α -ФП у больных, позитивных на поверхностный антиген гепатита В, а также страдающих хроническим активным гепатитом или циррозом печени. Полагают также, что пациентов с персистирующей инфекцией, в частности больных вирусным гепатитом С, также следует считать угрожаемыми по гепатоцеллюлярной аденокарциноме. Доказано, что риск развития этой опухоли при вирусном гепатите С и циррозе печени в 100 раз выше, чем у неинфицированных людей.

Одной из важных проблем при использовании α -ФП в дифференциальной диагностике гепатоцеллюлярной аденокарциномы являются гепатиты и цирроз печени, при которых уровень опухолевого маркера также повышается. Поэтому в дифференциальной диагностике вышеуказанных заболеваний помогает отделение фукозилированного α -ФП от нормального α -ФП путем связывания с лектинами. Определение этих фракций α -ФП помогает в дифференциальной диагностике гепатоцеллюлярной карциномы. Кроме того, при доброкачественных заболеваниях уровень α -ФП может увеличиваться временно, тогда как при гепатоцеллюлярной карциноме он повышен в сыворотке крови постоянно. Поэтому определение α -ФП несколько раз в течение 2–3 нед позволяет исключить ложноположительные его значения. Кроме того, недавно появился новый маркер в диагностике гепатоцеллюлярной аденокарциномы — des-gamma-carboxy prothrombin (DCP), также известный как PIVKA II (белок, индуцированный отсутствием витамина К). Сочетание этого маркера с α -ФП позволяет выявить в 86% гепатоцеллюлярную карциному и в 78,3% солитарную опухоль, и в этих случаях один из этих маркеров будет положительным.

4.4.4. НОВООБРАЗОВАНИЯ ОРГАНОВ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Новообразования половых органов у женщин составляют 15% всех опухолей, и они распределяются по частоте убывания в сле-

дующем порядке: рак тела матки, яичников и шейки матки. Однако в структуре смертности рак яичников занимает первое место, затем следует рак шейки и тела матки. Так, например, в США ежегодно регистрируются 20 000 новых случаев рака яичников и 12 000 умерших от этой опухоли. Этиология заболевания неизвестна, однако факторами риска считаются ановуляция, использование некоторых контрацептивов, а также семейная предрасположенность.

Опухоли яичников

Более 90% опухолей яичника имеют эпителиальную природу, т. е. возникают из целомического эпителия. Эпителиальные опухоли яичников классифицируются на основании типа клеток: серозные, муцинозные, эндометриоидные, светлоклеточные, смешанные эпителиальные, недифференцированные, плоскоклеточные. Чаще всего рак яичников развивается из серозных клеток.

Наилучшим маркером при эпителиальном раке яичников является муцин — СА 125. В период менструации уровень маркера у женщин может повышаться до 100 кУ/л и выше. Уровень СА 125 повышается почти у 80% больных с эпителиальными опухолями яичников, однако высокие показатели опухолевого маркера обнаруживаются только у половины больных при раке яичников I стадии согласно международной (FIGO) классификации этого заболевания. Недостаточная чувствительность при ранней диагностике, а также выявление повышенных значений СА 125 при различных доброкачественных новообразованиях и других аденокарциномах не позволяют использовать этот показатель как маркер раннего выявления рака яичников. Наряду с уровнем других маркеров (α -ФП, hCG, hCGb) уровень СА 125 может повышаться при опухолях из герминогенных клеток.

Прогноз рака яичников в основном зависит от стадии болезни. При скрининге СА 125 малочувствителен, и только 50% пациенток с I стадией болезни имеют повышенный уровень маркера, именно поэтому данный маркер не рекомендуют для выявления спорадических случаев заболевания. Однако определение СА 125 в комбинации с мануальным ректо-вагинальным исследованием органов малого таза и трансвагинальной ультра-

сонографией может иметь важное значение в раннем выявлении рака яичников.

Мультицентрическое проспективное исследование женщин в постменопаузе с новообразованиями в малом тазу и сравнение трансвагинальной ультрасонографии, мануального исследования органов малого таза и определения СА 125 (пороговое значение СА 125 35 kU/l) показали, что диагноз подтверждается этими методами в 77, 76 и 74% соответственно. Кроме того, с помощью регрессионного анализа показано, что по сравнению с ультрасонографией СА 125 более чувствителен, однако диагностическая ценность уступает таковой мануального исследования. Опухоли не выявляются при комбинации отрицательных результатов 3 методов. Определение уровня СА 125 перед операцией может подсказать врачу возможный объем хирургического пособия.

Известно, что традиционными прогностическими факторами у больных раком яичников считаются стадия заболевания, степень дифференцировки и гистологический тип опухоли, размер остаточной опухоли после паллиативной циторедуктивной операции. Вместе с тем многоцентровые исследования показали, что уровень СА 125 в сыворотке крови больных после 1, 2 и 3-го курсов химиотерапии являются одним из самых важных прогностических факторов раннего рецидива болезни. Удлиненный период полужизни СА 125 или менее чем 7-кратное снижение уровня опухолевого маркера в ранние месяцы после лечения указывают на плохой исход. Дальнейшие исследования показали, что концентрация СА 125 > 70 kU/l перед третьим курсом химиотерапии является наиболее важным фактором прогноза прогрессирования заболевания в ближайшие 12 мес.

СА 125 при мониторинге больных раком яичников позволяет выявить ранний рецидив. Однако в литературе еще не представлены данные, указывающие на то, что своевременное выявление рецидива болезни может улучшить показатели выживаемости. Увеличение уровня СА 125 свидетельствует о резидуальной болезни в 94,8% случаев, однако почти у половины больных с нормальными значениями маркера также имело место наличие болезни (опухолевых узлов) по данным «second-look»-лапаротомии. Уровни СА 125 увеличены в сыворотке крови 25% больных, которые имеют только микроскопические признаки болезни и у 79%

пациенток, диаметр рецидивной опухоли у которых равен более 1 см при лапаротомии.

Рак молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) — одна из основных причин смерти женщин в странах Западной Европы, и за время жизни женщины риск возникновения этой опухоли составляет 12,2%, а риск смерти от нее — 3,6%. Известно достаточно много факторов, которые ассоциируются с риском развития РМЖ: генетические и семейные факторы, гормональные (ранняя менархе, поздняя менопауза, поздняя первая беременность) факторы, диета, доброкачественные болезни молочной железы (в основном ассоциированы с атипичной гиперплазией).

В настоящее время известен ряд опухолевых маркеров при РМЖ: МИС-1 (СА 15-3), СЕА, онкопротеины, цитокератины. Наиболее широко используют СЕА и СА 15-3. Известны и другие члены семейства гена МИС-1: МСА, СА 519, BR27-29, BRMA. Все они имеют примерно одинаковую чувствительность и специфичность, как и СА 15-3. Поэтому использование нескольких маркеров сразу не вносит дополнения к информации, полученной с помощью СА 15-3. Ряд маркеров, такие, как цитокератины (TPA, TPS, CYFRA 21-1) и растворимые онкопротеины (с-erbB-2), в настоящее время интенсивно изучаются и проходят стадию клинической оценки.

Чувствительность опухолевых маркеров у больных с ранним РМЖ очень низкая (15–35%), поэтому их использование в диагностике зачастую затруднительно. Конечно, полученные низкие значения маркеров отнюдь не исключают наличия первичного и метастатического очагов. С другой стороны, высокие уровни маркера у больных РМЖ почти полностью свидетельствуют о наличии генерализации опухоли и отдельных метастазов.

Высокий уровень СЕА, СА 15-3 и других маркеров семейства МИС-1 однозначно связан со стадией РМЖ, размером опухоли и вовлечением в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов. Но пока неясно, являются ли эти маркеры независимыми факторами прогноза. Более того, неизвестно, будет ли использование такого опухолевого маркера как индикатора ран-

него рецидива болезни приводить к увеличению безрецидивной и общей выживаемости пациенток.

В случае радикального лечения РМЖ серийные определения СЕА и СА 15-3 в могут быть показаны также при ранней диагностике рецидива. Эти опухолевые маркеры в пределах 2–18 мес (в среднем 5,2 мес) обнаруживаются у 40–60% больных с рецидивом РМЖ еще до положительного ответа по результатам клинико-инструментальных и радиологических методов (рентгенография грудной клетки, ультрасонография печени, сканирование скелета). Динамическое определение уровня СЕА и СА 15-3 считается достаточно чувствительным тестом в ранней диагностике метастазов в кости и печень и, кроме того, снижает частоту проведения у больных как изотопного сканирования, так и радиоизотопных диагностических процедур.

Тканевые маркеры при раке молочной железы

В отличие от классических опухолевых маркеров, определяемых в сыворотке крови, клеточные или тканевые маркеры типично определяются непосредственно в опухолевой ткани. Большинство из них характеризуют определенные биологические особенности опухоли, специфику ее поведения и регуляции, например гормональную чувствительность или склонность к инвазии и метастазированию. Для некоторых молекулярных маркеров конкретная биологическая функция пока не установлена. Основное значение таких маркеров заключается в том, что они характеризуют биологические особенности каждой конкретной опухоли и помогают при прогнозировании и индивидуализации лекарственного лечения заболевания.

В табл. 4.10 представлены биологически значимые показатели, являющиеся действующими или потенциальными тканевыми маркерами РМЖ.

В общем случае определение молекулярного маркера при РМЖ может иметь 3 практических результата: 1) выявление среди больных с ранними стадиями рака групп риска, требующих дополнительного лечения, а также не подлежащих адъювантной терапии; 2) определение чувствительности к определенным видам терапии и индивидуализация схем адъювантного лечения

больных с распространенным процессом; 3) разработка новых препаратов.

Таблица 4.10. Основные группы тканевых/клеточных прогностических маркеров при раке молочной железы

Биологическое значение	Группа маркеров
Показатели эндокринной гормональной чувствительности	Рецепторы стероидных гормонов: РЭ, РП, РА
Показатели активности ауто- и паракринной регуляции пролиферации	Факторы роста и их рецепторы: РЭФР и его лиганды — ЭФР, α -ТФР, амфирегулин и др. HER2/neu и другие рецепторы семейства c-erbB Рецепторы ИФР-1 Рецепторы соматостатина
	Ферменты и белки, участвующие в передаче митогенных сигналов: рецепторные тирозинкиназы, МАП-киназы, ФИЗК, Akt-1, Grb2 и др.
Показатели метастатической и инвазивной активности	Компоненты системы активации плазминогена: uPA, PAI-1, рецептор uPA, PAI-2, tPA
	Металлопротеазы и их ингибиторы
	Другие протеолитические ферменты (катепсин D, строелизин и др.)
	Интегрины
Показатели неоангиогенеза	VEGFA и его рецепторы flt-1 и flk-1
	VEGFC и его рецептор flt-4
	Другие ангиогенные факторы: FGF, тимидин-фосфорилаза, TNF, интерлейкины и др.
Регуляторы апоптоза	Супрессорные гены и их продукты: p53, ген ретинобластомы
	Проапоптотические факторы: bcl-2, Fas-рецептор и Fas-лиганд
Показатели, не имеющие четко выраженной биологической роли при РМЖ	Белок pS2
	Онкогены: c-мус, int-2 и др.

Одними из первых вошедших в практику лечения больных РМЖ показателей, относящихся к категории клеточных марке-

ров, были рецепторы стероидных гормонов, в первую очередь рецепторы эстрогенов (РЭ). Несколько позднее в дополнение к ним стали определять также рецепторы прогестерона (РП).

Присутствие РЭ в первичной опухоли молочной железы свидетельствует о ее потенциальной чувствительности к лечебным мероприятиям, направленным на удаление источника эстрогенов из организма или на противодействие их эффектам (овариэктомия, использование антиэстрогенов).

РП представляет интерес как молекулярный маркер РМЖ не только потому, что он является первым звеном реакции клетки на прогестины, определяя чувствительность к соответствующим препаратам, но и потому, что его синтез в клетках РМЖ индуцируется эстрогенами. Таким образом, наличие РП может свидетельствовать о функциональной активности РЭ.

В настоящее время в различных клиниках и лабораториях используется 3 относительно равнозначных метода определения рецепторного статуса РМЖ: радиолигандный — оценка связывающей способности рецепторов в цитозолях опухолей; иммуноферментный — определение концентрации иммунореактивного рецепторного белка в тех же цитозолях; иммуногистохимический — специфическое окрашивание срезов опухоли с помощью антител к рецепторным белкам. Преимуществом первых 2 методов является количественный характер, позволяющий объективизировать критерии оценки рецепторного статуса. Радиолигандный метод позволяет также оценить и функциональную активность рецептора на одной из первых стадий его взаимодействия с гормоном, что делает прогноз гормоночувствительности более надежным, чем при определении иммунореактивных белков.

С другой стороны, иммуногистохимический метод хотя и носит полуколичественный характер, однако имеет важное достоинство, заключающееся в том, что при окрашивании срезов можно четко определить принадлежность рецепторов именно опухолевым клеткам. При использовании биохимических методов такая возможность отсутствует. Кроме того, этот метод позволяет работать с архивным материалом — парафиновыми блоками и даже готовыми стеклами, что делает его единственно возможным вариантом в тех случаях, когда необходимость ис-

следования рецепторов стероидных гормонов возникла или была осознана через длительное время после операции.

Известно, что гормонально-зависимый вариант РМЖ, когда типизируются оба или хотя бы один из рецепторов стероидных гормонов, характеризуется благоприятным течением, а послеоперационный период у таких больных протекает лучше, чем в случае рецепторотрицательных опухолей. Тем не менее в практической клинической работе результаты определения рецепторов стероидных гормонов в основном используют при отборе больных, чувствительных к эндокринной терапии.

Рецепторы факторов роста. В эту группу относят и сами факторы роста — белки и небольшие полипептиды, продуцируемые собственно опухолевыми клетками и другими компонентами опухолевой ткани (фибробластами, инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, эндотелиальными клетками) и стимулирующие рост клеток-продуцентов (аутокринный механизм) или соседних клеток (паракринный механизм).

В аутокринной и паракринной регуляции пролиферации клеток РМЖ участвуют различные ростовые факторы: пептиды группы ЭФР (α -трансформирующий фактор роста, амфирегулин и др.), взаимодействующие с общим рецептором, инсулиноподобные факторы роста (ИФР), соматостатин и др. Рецепторы этих ростовых факторов были обнаружены в опухолях больных РМЖ. Наличие в опухоли молочной железы РЭФР, в особенности в отсутствие рецепторов стероидных гормонов, свидетельствует о неблагоприятном прогнозе заболевания даже на ранних стадиях и о резистентности к эндокринной терапии. Существуют данные о том, что наличие рецепторов ИФР и рецепторов соматостатина указывает на более благоприятный прогноз РМЖ.

Тем не менее из-за неоднозначности результатов, полученных разными авторами, ни один из показателей, характеризующих чувствительность РМЖ к ауто- и паракринным регуляторам, пока не вошел в рутинную клиническую практику, как, например, исследование уровня рецепторов стероидных гормонов. Можно ожидать, однако, что в ближайшее время интерес к исследованию РЭФР при РМЖ вновь возрастет, в связи с тем что уже на стадии клинических испытаний вышли препараты, специфически воздействующие на РЭФР, — моноклональные антитела

к рецептору и ингибиторы внутренней тирозинкиназы РЭФР, реализующей первый этап передачи митогенного сигнала.

Следует отметить, что до настоящего времени «золотым стандартом» при исследовании РЭФР считается радиолигандное определение в мембранной фракции тканей с использованием ^{125}I -меченного ЭФР и последующего разделения на гидроксил-апатите.

Определенные успехи в области практического использования маркеров, связанных с РЭФР-зависимой регуляцией роста РМЖ, уже достигнуты после появления препарата герцептина, представляющего собой гуманизированные антитела к HER2/неу — одному из рецепторов семейства ErbB, к которому принадлежит и РЭФР.

Семейство тирозинкиназных рецепторов — продуктов онкогенов группы c-erbB, в которое входят 4 сходных по структуре трансмембранных рецептора, — РЭФР (ErbB-1), ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4) — одна из важнейших регуляторных систем передачи митогенного сигнала.

Помимо структуры, рецепторы семейства ErbB отличаются между собой по относительной специфичности и средству к различным общим лигандам. Основной особенностью всех рецепторных тирозинкиназ являются трансмембранная локализация и необходимость во взаимодействии с соответствующим лигандом (активирующим фактором) для реализации киназной активности и последующих биологических эффектов. После активации в результате связывания лигандов и димеризации внутреннего тирозинкиназа рецепторов активируется и приобретает способность фосфорилировать как сам рецептор, так и другие клеточные белки, участвующие в передаче митогенного сигнала. Рецепторы семейства ErbB могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, при этом во многих случаях наиболее активными являются гетероструктуры с участием рецептора HER2/неу, не имеющего собственного лиганда.

Таким образом, HER2/neu — это уникальный представитель рассматриваемого семейства трансмембранных тирозинкиназ, так как, не имея собственного лиганда и не взаимодействуя ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, он является тем не менее ключевым звеном

передачи митогенных сигналов всех ЭФР-подобных пептидов и необходим для успешного функционирования всей системы.

Что касается прогностического значения гиперэкспрессии или амплификации гена *c-erbB-2*, то, несмотря на гигантский материал (к настоящему времени в различных лабораториях мира обследовано уже более 12 000 больных РМЖ), единого мнения о прогностической ценности HER2/неу пока нет. Некоторые авторы отмечают его неблагоприятное влияние на безрецидивную выживаемость больных РМЖ без метастазов в лимфатических узлах, другие исследователи не находят достоверной взаимосвязи этих показателей. Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что опухоли с амплифицированным геном HER2/неу слабо реагируют на гормональную терапию, но чувствительны к последующей химиотерапии. В настоящее время принято считать также, что больным с HER2/неу-положительными опухолями следует рекомендовать более интенсивные режимы химиотерапии, чем больным с опухолями, не имеющими повышенной экспрессии этого онкогена.

Система активации плазминогена. Способность к метастазированию и инвазии — одно из фундаментальных свойств злокачественных опухолей, важнейшим механизмом которого является разрушение окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами. Эти протеазы также участвуют в неоангиогенезе, способствуя распространению новых сосудов в опухоли.

Протеолитический каскад активации плазминогена в опухолевой ткани занимает центральное место. Считается, что плазмин, который способен уменьшить уровень внеклеточных матричных гликопротеидов и активировать некоторые прометаллопротеазы, например коллагеназу IV типа, играет решающую роль как в локальном распространении опухоли, так и в формировании метастазов в отдаленных органах и тканях. В многоступенчатой цепочке протеаз, ведущей к разрушению внеклеточного матрикса, ключевую позицию занимает активатор плазминогена урокиназного типа (uPA). Важную роль играет также находящийся на поверхности клеток рецептор uPA, поскольку при связывании с ним способность uPA активировать плазминоген увеличивается. В целом процесс образования плазмина пред-

ставляет собой циклическую амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи.

Помимо uPA, в активации плазминогена участвует также активатор тканевого типа (tPA), однако его роль при развитии опухолей, по-видимому, противоположна и сводится к разрушению опухолевых клеток и защите окружающих тканей. Активность uPA и tPA подавляется 2 белковыми ингибиторами, принадлежащими к семейству серпинов, — PAI-1 и PAI-2. На основании экспериментальных и клинических данных считается, что при опухолевом росте 2 ингибитора активаторов плазминогена также играют разную роль: PAI-1 защищает опухолевые клетки от саморазрушения, а PAI-2 тормозит протеолитические процессы во внеклеточном матриксе.

Различные компоненты системы активации плазминогена в ткани РМЖ могут находиться как на самих опухолевых клетках, так и на фибробластах стромы, инфильтрирующих опухоль лимфоцитах и макрофагах, эндотелиальных клетках. В связи с этим можно считать, что процесс активации плазминогена носит преимущественно паракринный характер.

Уровень и соотношение экспрессии компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани могут служить показателем метастатической и инвазивной активности опухоли, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза при злокачественных опухолях или показателем риска малигнизации при доброкачественных новообразованиях. Кроме того, подавление активации плазминогена по урокиназному типу на различных уровнях может стать одним из подходов к разработке новых видов антиметастатической терапии, для эффективного использования которых в клинике необходимо выявлять группы больных, потенциально чувствительных к такому лечению. Разработки подобных препаратов уже достаточно активно ведутся в экспериментальных лабораториях и фармацевтических фирмах, что делает исследование их белков-мишеней в опухолях человека особенно актуальным.

Наиболее адекватным методом оценки уровня экспрессии компонентов системы активации плазминогена считается в настоящее время количественное иммуноферментное определение их концентрации в цитозолях тканей. К сожалению, единые

пороговые значения пока не установлены, хотя уже проводятся международные кооперированные исследования в этом направлении.

Фактор роста эндотелия сосудов. В последние годы большое внимание уделяется проблеме неоангиогенеза — формирования новых сосудов — в злокачественных опухолях. В отличие от васкулогенеза ангиогенез — это процесс ответвления новых капиллярных отростков от уже существующих кровеносных сосудов. Уже не вызывает сомнения тот факт, что опухоль не может развиваться и расти без образования в ней разветвленной сети капилляров, обеспечивающих снабжение клеток кислородом и питательными веществами. Изучение молекулярных механизмов ангиогенеза позволило перейти от микроскопической оценки плотности сосудов в опухолевой ткани к исследованию конкретных молекул, участвующих в регуляции образования и роста новых сосудов. Важнейшим положительным регулятором ангиогенеза, бесспорно, является VEGF, называемый также фактором проницаемости сосудов. Уникальность этого фактора заключается в том, что в отличие от всех других факторов роста он митогенен только по отношению к эндотелиальным клеткам. Доказано, что VEGF играет ключевую роль в неоангиогенезе при РМЖ.

Результаты ряда ретроспективных клинических исследований, опубликованные в самое последнее время, свидетельствуют о том, что экспрессия VEGF при РМЖ имеет, по-видимому, существенное значение для прогноза заболевания, а также влияет на чувствительность опухолей к гормональному и лекарственному лечению. Его высокий уровень свидетельствует о неблагоприятном прогнозе как при раннем, так и при распространенном РМЖ. Кроме того, в настоящее время активно создаются и исследуются новые препараты с антиангиогенными свойствами, и оценка активности VEGF-зависимого ангиогенеза может стать основой для их целенаправленного применения.

Рак шейки матки

Практически во всем мире рак шейки матки после РМЖ занимает второе место по смертности от опухолевых заболева-

ний. Основными факторами риска данного заболевания считают социально-экономические, раннее замужество, большое число половых партнеров, а также инфекции, вызванные вирусом папилломы человека (HPV) (типы 16, 18, 31 и 45). Показатели 5-летней выживаемости при данном заболевании составляют около 70%. Однако при выявлении новообразования в ранней стадии 5-летняя выживаемость увеличивается до 90%. Следует отметить, что 90% опухолей шейки матки представлены плоскоклеточным раком, из других гистологических типов — это аденокарцинома и плоскоклеточная карцинома. Очень редко обнаруживаются саркомы или нейроэндокринный рак.

В диагностике плоскоклеточной карциномы шейки матки используется как опухолевый маркер антиген SCCA — белок (молекулярная масса 48 кД) с сильной гомологией семейства ингибиторов протеаз, так называемых серпинов. Чувствительность метода при I стадии заболевания составляет менее 30%, а при IV стадии — 90%. Однако экспрессия SCCA может увеличиваться и при других плоскоклеточных опухолях (рак легкого, опухоли головы и шеи, рак пищевода и влагалища), при доброкачественных новообразованиях кожи (псориаз, экзема), легких (саркоидоз), печени и почек. В скрининге этот опухолевый маркер не используется.

Для скрининга рака шейки матки предложена во всем мире программа Papanicolaou, инструментальные и морфологические диагностические методы, которые позволяют диагностировать преинвазивные опухоли: карциному *in situ* (CIS) и интраэпителиальную неоплазию шейки матки (CIN). Развитие этих процессов в течение 10–15 лет может предшествовать раку шейки матки. В диагностике ранних стадий SCCA не используется, поскольку уровень опухолевого маркера зависит от объема первичной опухоли, стадии и вовлечения в опухолевый процесс лимфатических узлов. Повышенный уровень SCCA до лечения может служить независимым фактором в оценке метастатического поражения регионарных лимфатических узлов.

Высокие значения маркера до лечения указывают на плохой прогноз у больных плоскоклеточным раком шейки матки. В некоторых исследованиях показано, что SCCA может быть использован как независимый прогностический фактор при раке

шейки матки. При аденокарциномах шейки матки как фактор прогноза более полезен СА 125, но не SCCA.

Маркер SCCA определяют для выявления раннего рецидива плоскоклеточной карциномы шейки матки, а также при мониторинге перед неоадъювантной терапией и перед терапией рецидивных опухолей. В этих случаях корреляционная связь составляет 80%, что имеет существенное клиническое значение при отборе больных для последующей лучевой терапии или хирургического лечения.

Рак эндометрия

Рак эндометрия составляет 50% всех злокачественных опухолей урогенитального тракта у женщин, а в 80% случаев обнаруживается при обследовании матки. Выживаемость при I стадии составляет 80%, при IV — 10%. В 60–80% случаев опухоли имеют строение аденокарциномы.

Чаще всего при раке эндометрия повышается опухолевый маркер СА 125: при I–II стадии болезни до 22%, а при III–IV стадии — до 80% уровень маркера выше 35 кУ/л. Не существует опухолевого маркера для скрининга с целью раннего выявления рака эндометрия. Морфологическое исследование считается традиционным методом диагностики рака эндометрия, а образцы тканей получают после выскабливания слизистой оболочки полости матки.

В мониторинге рака эндометрия лучшим маркером считается СА 125. У 60% больных с ранним рецидивом опухоли выявлено повышение в сыворотке крови именно СА 125.

4.4.5. РАК ЛЕГКОГО

В экономически развитых странах мужского населения от злокачественных новообразований рак легкого составляет 21% в структуре общей смертности. Рак легкого представляет прототип опухоли, индуцируемой химическими канцерогенами. Выявлена тесная связь развития рака легкого с курением сигарет, однако не у всех курильщиков развивается рак, а только в 5–10%, что свидетельствует о важной роли генетической предрасположенности у этих пациентов. Почти в 50% случаев при первичной

диагностике может быть рекомендовано хирургическое лечение, однако только у 70% из них опухоль является резектабельной.

Основные гистологические типы рака легкого: плоскоклеточный (ПРЛ), аденокарцинома, крупноклеточная карцинома и мелкоклеточный рак легкого (МРЛ). Следует отметить, что МРЛ отличается от других гистологических типов опухолей легкого особенностями клинического течения. Поэтому все злокачественные опухоли легкого разделяют на МРЛ и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), которые входят в гетерогенную группу опухолей.

При раке легкого наиболее часто исследуются следующие маркеры: нейронспецифическая енолаза (НСЕ), РЭА, 19 фрагмент цитокератина (CYFRA 21-1), плоскоклеточный раковый антиген (SCC), СА 125, тканевый полипептидный антиген (ТПА).

Нейронспецифическая енолаза впервые была обнаружена в нейронах мозга и периферической нервной системе. НСЕ представляет собой изофермент цитоплазматического гликолитического фермента енолазы (2-фосфо-Д-глицерат-гидролаза, КФ 4.2.1.11) и состоит из 2 практически идентичных полипептидных цепей γ -типа, молекулярная масса каждой равна 39000 Д. В мозге наряду с НСЕ обнаруживается также изоформа — димер из субъединиц α -типа и гибридный изофермент $\alpha\gamma$, обладающие сходным сродством к субстрату — 2-фосфоглицериновой кислоте. Енолаза, содержащая эту γ -субъединицу (α - γ и γ - γ) была названа НСЕ. Изоформы могут синтезироваться глиальными клетками мозга, а также большинством клеток соматических тканей. Сам фермент синтезируется в центральных и периферических нейронах и злокачественных опухолях нейроэктодермального происхождения (МРЛ, нейробластомы, интестинальные карциноиды).

Показано, что верхняя граница нормы НСЕ у здоровых людей — 12,5 нг/мл. Учитывая, однако, что концентрация НСЕ до 20 нг/мл и более может встречаться и при доброкачественных заболеваниях легких, для клинической диагностики предпочтителен более высокий уровень порогового значения маркера (> 25 нг/мл). Повышение активности НСЕ в сыворотке крови обнаружено у 40–70% первичных больных МРЛ и у 83–98% пациентов при распространенной стадии заболевания.

По данным, представленным Memorial Sloan Kettering Cancer Center (США), частота увеличения активности НСЕ в сыворотке крови больных МРЛ зависит от распространенности опухолевого процесса: при I–II стадии чувствительность теста составляет 39%, при III–IV — 87%. Следует отметить, что при анализе диагностической значимости многие авторы выявляют достаточно высокую специфичность НСЕ по сравнению с другими маркерами. Так, активность НСЕ при эмфиземе легких повышалась только в исключительных случаях, в отличие от которой концентрация РЭА была увеличена в 7–36% наблюдений. Результаты исследований свидетельствуют о том, что НСЕ вполне применим в качестве опухолевого маркера выбора как при дифференциальной диагностике, так и при мониторинге эффективности терапии МРЛ.

Вместе с тем обнаружено повышение активности НСЕ в сыворотке крови больных туберкулезом (27,3%), а также у пациентов, инфицированных вирусом HIV, по сравнению с неинфицированными. Пациенты с альвеолярными инфильтратами или интерстициальными очагами в легких имели также значительно повышенный уровень НСЕ в сыворотке крови. Полагают, что увеличение НСЕ в сыворотке крови у больных с доброкачественными заболеваниями легких связано с локальной гипоксией. Представленные результаты следует учитывать при анализе НСЕ у больных раком легкого и при обструктивных процессах легких.

Необходимо отметить, что, учитывая значительную гетерогенность рака легкого, в частности мелкоклеточного варианта, можно отметить существенную диагностическую и прогностическую значимости НСЕ по сравнению с другими опухолевыми маркерами.

Раково-эмбриональный антиген, представленный гликопротеином с молекулярной массой около 180 кД, также принадлежит к группе онкофетальных антигенов, синтезируемых и секретируемых кишечными клетками эмбриона и плода, а также некоторыми злокачественными опухолями (рак молочной железы, желудка, легкого). Впервые РЭА обнаружен у больных раком толстой кишки. В настоящее время РЭА-подобные соединения выявлены также на мембранах клеток в неэмбриональных и нераковых тканях. Есть все основания полагать, что печень

является основным местом метаболизма РЭА. Уровень РЭА в сыворотке крови повышен у 40–80% больных со злокачественными новообразованиями эндодермального происхождения, у 20–30% с другими формами рака и у 10–20% с доброкачественными опухолями. Наибольшая чувствительность РЭА и самые высокие концентрации маркера обнаружены при аденокарциноме и крупноклеточном раке легкого.

Сывороточный антиген плоскоклеточной карциномы — это белок с молекулярной массой 48 кД, который сходен с серпинами (ингибиторами протеаз). Маркер используют в диагностике плоскоклеточного рака в различных органах (рак шейки матки, пищевода, легкого, опухоли головы и шеи). Более чем у 70% больных ПРЛ его уровень повышен. Однако лишь в 26,1% уровень опухолевого маркера повышается в сыворотке крови при аденокарциноме легкого и не обнаруживается при МРЛ. У 87,8% больных с ранним рецидивом ПРЛ отмечается высокий уровень SCC в сыворотке крови. Очень важное практическое значение имеет выявление экспрессии SCC при иммуногистохимическом исследовании опухолей легкого.

Тканевый полипептидный антиген — полидисперсная смесь цитокератинов 8, 18 и 19 (молекулярная масса от 20 до 45 кД), которая способна полимеризоваться в растворе с образованием олигомеров. Активность ТПА зависит от аминокислотной последовательности и положения остатка аргинина. В норме содержится в высокой концентрации в плаценте и эмбриональных тканях. Локализуется ТПА на плазматической мембране и эндоплазматическом ретикулуме опухолевых клеток, продуцируется пролиферирующими клетками и высвобождается в окружающую среду спонтанно. ТПА обнаруживается практически во всех злокачественных опухолях.

Фрагмент цитокератина 19. Значимость цитокератина для дифференциации физиологической и патологической ткани давно была известна в гистопатологии. Цитокератины являются неразрывными клеточными белками, более 20 из них в настоящее время хорошо охарактеризованы с помощью моноклональных антител. В отличие от целой молекулы фрагменты цитокератина растворимы в сыворотке. В тесте на опухолевый маркер CYFRA 21-1 используются два типа моноклональных антител

(Ks 19.1 и BM 19.21) для выявления фрагмента цитокератина 19 с молекулярной массой 30 кД. Верхняя граница нормы у здоровых людей равна 2,3 нг/мл. Тест CYFRA 21-1 обладает хорошей специфичностью по отношению к доброкачественным заболеваниям легких, уровень порогового значения — 3,3 нг/мл. Маркер обладает высокой чувствительностью в диагностике НМРЛ.

Не выявлено связи CYFRA 21-1 с курением. Показано, что уровень CYFRA 21-1 одинаков в сыворотке крови больных с незлокачественными заболеваниями легких, МРЛ и в контрольной группе. В то же время значительно более высокие уровни CYFRA 21-1 отмечены у больных НМРЛ, аденокарциномой и ПРЛ. Представленные данные подтвердили высокую чувствительность и специфичность CYFRA 21-1 в дифференциальной диагностике между злокачественными и незлокачественными заболеваниями легких, так же как и между МРЛ и НМРЛ. Больные с метастазами в лимфатических узлах N2 и N3 имеют наиболее высокий уровень CYFRA 21-1 в сыворотке крови (5,6 нг/мл) (пределы колебания 3,2–11,5 нг/мл) в сравнении с пациентами с N0 и N1 (3,9–10 нг/мл) (Mann–Whitney U-тест; $p=0,0373$).

При всех видах рака легкого CYFRA 21-1 имеет наиболее высокую чувствительность (57,7%) по сравнению с РЭА (45,3%) и SCC (22,6%). Несмотря на то что при сочетании CYFRA 21-1 и РЭА для диагностики НМРЛ показатели чувствительности и точности повышаются до 75,4 и 78,1% соответственно, однако специфичность снижается до 86,5%.

Японские исследователи (University of Tsukuba) предлагают использовать в целях повышения диагностики и дифференциальной диагностики рака легкого определение уровня CYFRA 21-1 в плевральной жидкости в дополнение к цитологическому исследованию. Это связано с тем, что в плевральной жидкости у больных раком легких выявлено достоверное повышение маркера (в среднем 84,5 нг/мл) по сравнению с больными с доброкачественными опухолями (13,9 нг/мл). Кроме того, уровень CYFRA 21-1 в плевральной жидкости больных ПРЛ значительно отличаются от такового при пневмонии, тогда как РЭА не выявляет таких различий.

При определении CYFRA 21-1 следует помнить о возможном увеличении уровня до 10 нг/мл при прогрессирующих доброкачественных заболеваниях печени и особенно при почечной недостаточности. Загрязнение образца элементами слюны может также привести к значительному повышению значения CYFRA 21-1. При этом на результат не влияют пол, возраст, курение и беременность. Исследования всех типов солидных опухолей показали, что CYFRA 21-1 является результативным маркером при НМРЛ и ПРЛ.

В заключение рассмотрим некоторые особенности использования в клинике маркеров злокачественного роста на примере рака легкого.

Прежде всего использовать все вышеуказанные маркеры в скрининге бессимптомного рака легкого или у больных с высоким риском развития этого вида опухоли не следует. Первичная диагностика и первичная терапия больных раком легкого основываются на клинических и инструментальных методах обследования (общеклиническое, эндоскопическое, рентгенологическое, интраоперационные находки).

Далее маркер HCE следует считать крайне важным при иммуногистохимической диагностике варианта опухоли. Часто только определение HCE в сыворотке крови помогает подтвердить диагноз МРЛ.

Концентрация SCC в сыворотке крови $> 2 \text{ mg/l}$ указывает на 95% вероятность обнаружения НМРЛ и 80% — плоскоклеточный рак легкого.

При уровне СА 125 более 100 U/ml и РЭА выше 10 mg/l следует предполагать аденокарциному или крупноклеточный рак легкого.

И наконец, хотя часто концентрация в сыворотке крови CYFRA 21-1, ТРА, HCE, РЭА показывает наличие опухоли, не отмечается стойкой зависимости между продукцией опухолевых маркеров и гистологическим вариантом опухоли легкого. В большинстве случаев высокий уровень в этом случае указывает на распространенность опухолевого процесса, а следовательно, и прогноз должен быть неутешительным. Однако низкие и средние значения этих маркеров никогда не позволяют полностью

исключить какой-либо вариант опухоли или прогрессирование заболевания.

Несмотря на все вышеуказанные ограничения, опухолевые маркеры в первичной диагностике рака легкого могут иметь большое значение в следующих ситуациях.

Во-первых, ассоциированные с опухолью антигены, экспрессирующиеся во время установления первичного диагноза, следует использовать в мониторинге у данного пациента. CYFRA 21-1, РЭА и СА 125 являются высокозначимыми прогностическими факторами при НМРЛ, а НСЕ — при МРЛ.

Во-вторых, снижение уровня опухолевых маркеров в послеоперационном периоде (~2–3 дня для РЭА, 1 день для НСЕ, несколько часов для CYFRA 21-1) дает врачу полезную информацию о радикальности выполненного хирургического вмешательства и эффективности терапии, а стало быть, и о хорошем прогнозе. С другой стороны, медленное снижение уровня маркера в сыворотке крови свидетельствует о нерадикальности проведенной операции и предполагает наличие резидуальных очагов опухоли.

В-третьих, постепенное повышение опухолевого маркера может служить первым признаком рецидива болезни. Такое увеличение может быть обнаружено за 12 мес до клинических признаков рецидива. Для рака легкого НСЕ может служить критерием дифференциальной диагностики различных гистологических типов опухоли, особенно в тех случаях, когда не удастся провести биопсию и подтвердить данными морфологического исследования тип опухоли.

4.5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

Основной задачей современной молекулярно-генетической диагностики (МГД, ДНК-диагностика) является обнаружение наследственных аномалий для последующего использования в диагностике, составления прогноза и выбора стратегии лечения многих заболеваний. При этом МГД рассматривается значительно шире, чем просто анализ последовательности геномной ДНК человека, поскольку практически всегда дополнительную информацию о наследственном заболевании можно также получить,

анализируя состояние и самих хромосом, и РНК, и белков, и метаболитов.

Как и другие методы клинической биохимии, генетическое тестирование применяется для дифференциальной диагностики заболеваний. При ряде заболеваний, например при наследственных формах рака или «ошибках метаболизма», обнаружение мутаций становится не менее важным диагностическим критерием, чем клиническая симптоматика. Однако, безусловно, главным достоинством ДНК-диагностики является возможность определения предрасположенности к определенному заболеванию на пресимптоматической стадии. В ряде случаев это дает возможность путем хирургического вмешательства, лекарственной терапии или изменения стиля жизни пациента предотвратить развитие самой болезни. Кроме того, проведение пренатального ДНК-тестирования позволяет выявлять наследование патологических генов и, соответственно, определять показания для искусственного прерывания беременности.

Необходимо отметить и такое перспективное направление МГД, как фармакогенетика. Точное типирование генотипа пациента позволяет оценивать гены, непосредственно связанные с всасыванием, метаболизмом и действием лекарств, т.е. появляется реальная возможность выявлять больных, особо чувствительных к определенному препарату, и избегать в процессе лечения осложнений, обусловленных непереносимостью данного лекарства. В некоторых случаях генотипирование также позволяет выбрать наиболее адекватное лекарство. Уже сейчас можно с уверенностью утверждать, что по мере развития фармакогенетики лекарственная терапия будет все больше опираться на анализ генотипа пациента.

Таким образом, использование МГД в клинической практике открывает широкие возможности не только для диагностики и оценки генетического риска заболеваний, но и для подбора индивидуальной лекарственной терапии. Можно надеяться, что активное развитие молекулярной генетики человека поставит ДНК-диагностику в один ряд с такими незаменимыми инструментами в арсенале врача-биохимика, как, например, методы определения активности ферментов в крови.

4.5.1. ТИПЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПЕРЕСТРОЕК

В популяции обычно встречается несколько вариантов (аллелей) каждого гена. Если частота таких вариантов достаточно высока и не может быть объяснена случайным возникновением одинаковых мутаций в разных семьях, то говорят о полиморфизме данного локуса.

Более редкие варианты генов относят к мутациям. Какова же граница между полиморфизмом и мутациями? Принято считать, что к полиморфизму относят варианты генов, встречающиеся в гетерозиготной форме более, а к мутациям менее, чем у 1% популяции. Однако на практике мутантными часто называют аллели, предрасполагающие к той или иной патологии даже в том случае, если их частота в популяции выше 1%. Ниже перечислены типы мутаций, которые могут приводить к патологическим изменениям.

- *Миссенс-мутации*, или замена нуклеотидов, — самый частый тип мутаций. Замена нуклеотидов в некоторых положениях кодонов не приводит к замене кодируемой аминокислоты; такие мутации называются молчащими или синонимичными. При изменении кодируемой аминокислоты в результате миссенс-мутации функция белка часто меняется. Сохранение функции белка наблюдается в том случае, если происходящая от мутантного кодона аминокислота принадлежит к тому же структурному классу, что и свойственная норме аминокислота. Максимальное влияние на белок оказывают однонуклеотидные замены, приводящие к образованию стоп-кодона (*нонсенс-мутации*). Укороченные мРНК и белок часто неактивны и быстро деградируют.

- *Делеции и инсерции*. Такого рода мутации варьируют по длине от одного до миллионов нуклеотидов и, соответственно, носят название микро- и макроделеции (инсерции). Понятно, что макромутации затрагивают очень большие участки хромосом (с 10 млн. пар нуклеотидов), т.е. появляется возможность их обнаружения с помощью цитогенетического анализа. Микромутации затрагивают небольшое количество нуклеотидов, и для их поиска используются методы анализа нуклеотидной последовательности ДНК. Небольшие инсерции и делеции могут не влиять на функцию кодируемого белка. Фатальные последствия обычно

наблюдаются, когда количество нуклеотидов инсерции/делеции не кратно 3. При этом происходит сдвиг рамки считывания и синтезируется бессмысленная аминокислотная последовательность. Чаще всего она очень быстро прерывается за счет образования нового стоп-кодона. Классическим примером влияния сдвига рамки на последствия делеции являются 2 родственных заболевания — миодистрофии Дюшенна и Беккера. Оба вызываются мутациями в гене дистрофина, причем 2/3 этих мутаций — при обоих заболеваниях делеции. Миодистрофия Беккера протекает значительно мягче, чем Дюшенна, однако эта разница не связана с размером делеций. Причиной отличий является то, что в большинстве выявленных случаев миодистрофии Дюшенна делеции приводят к сдвигу рамки считывания, и в результате дистрофин перестает образовываться совсем, в то время как при миодистрофии Беккера мутантный дистрофин сохраняет некоторую активность.

- В ряде случаев мутации затрагивают некодирующие участки ДНК, участвующие в инициации транскрипции данного гена или сплайсинге мРНК. Такие изменения могут также приводить к нарушению структуры, стабильности или нормальной регуляции экспрессии данного белка.

- *Нестабильные, или динамические*, мутации развиваются обычно в участках, содержащих множественные копии тринуклеотидных повторов. В результате ошибок репликации ДНК или неравного кроссинговера число таких повторов может возрастать либо уменьшаться, вследствие чего такие мутации и называли динамическими. Если число повторов превышает некоторую пороговую величину, нарушается функция данного или близлежащих генов. Механизмы выключения генов при накоплении тринуклеотидных повторов не совсем ясны. В частности, при синдроме ломкой X-хромосомы возрастание числа повторов CGG в локусе FRAXA выше 200 ведет к метилированию и инактивации данного гена. Возрастание числа тринуклеотидных повторов лежит также в основе болезни Гентингтона (свыше 35 CAG-повторов в гене Гентингтона) и миотонической дистрофии (свыше 50 повторов в 3'-нетранслируемой области гена DMPK, кодирующего протеинкиназу). Характерным признаком этих заболеваний является то, что в одной семье тяжесть заболевания может

возрастать в ряду поколений за счет экспансии нуклеотидных повторов.

В общем случае появление мутаций приводит к изменению функции или экспрессии белка. Данное изменение проявляется как увеличением, так и уменьшением, часто вплоть до полной потери, функции или экспрессии белка. В случае функционального увеличения возможно также приобретение белком новых функций.

МУТАЦИИ С ПОТЕРЕЙ ФУНКЦИИ

Снижение функциональной активности белка в ткани может являться результатом изменения как структуры белка, так и транскрипционной активности данного гена. Например, снижение уровня экспрессии рецептора ЛПНП за счет мутации в промоторной области будет приводить к точно такой же гиперхолестеринемии, которая наблюдалась бы в случае синтеза нормальных количеств функционально неполноценного рецептора, не способного связывать или интернализировать липопротеиды.

Изменение структуры белка, вызванное аминокислотными заменами или нарушение процессинга мРНК в результате мутаций в участках сплайсинга, приводит к появлению аномальных мРНК и белков, подверженных ускоренной деградации, в результате чего общее количество активного белка снижается. Например, 3 наиболее часто встречающихся дефектных аллеля гена тиопуринометилтрансферазы кодируют быстродеградирующие белки, в результате чего активность фермента резко снижается, что сопровождается повышенной чувствительностью пациентов к тиопуринам. В других случаях, например при α -талассемии, может наблюдаться делеция всего гена, приводящая к полному отсутствию продукта.

Механизмы потери собственно функциональной активности белка могут быть самыми разнообразными. В результате мутаций может происходить замена аминокислот, играющих ключевую роль в структуре или каталитической активности. В результате мутаций может нарушаться нормальный процессинг или транспорт белка. Например, наиболее частая мутация, вызывающая кистозный фиброз, — делеция фенилаланина в положении 506 гена CFTR — не влияет на синтез или функциональную

активность данного белка, но нарушает его внутриклеточный транспорт, в результате чего он не включается в плазматическую мембрану и поэтому теряет способность к функционированию в качестве хлорного канала.

Как правило, мутации с потерей функции приводят к заболеваниям с рецессивным типом наследования. Это связано с тем, что для полноценного функционирования метаболического пути обычно хватает того количества активного белка, которое производится одним нормальным аллелем. И таких заболеваний большинство.

Реже встречаются случаи, когда количества синтезируемого белка становится недостаточно. В этом случае заболевание начнет проявляться даже при наличии одного мутантного аллеля, а наследование становится доминантным. Таких заболеваний известно немного, одним из них является семейная гиперхолестеринемия, вызванная дефектом гена рецептора ЛПНП. Для этого заболевания характерен еще и *эффект дозы гена*, проявляющийся в том, что семейная гиперхолестеринемия протекает гораздо тяжелее у гомозигот по сравнению с гетерозиготами.

Доминантный тип наследования проявляется и когда мутантный белок не только теряет свою активность, но и препятствует функционированию продукта нормального аллеля у гетерозигот. Эта ситуация вошла в литературу под названием *доминантно-негативного эффекта*. Такой эффект обнаруживается в случае мультимерных белков, к которым, в частности, относятся коллагены или димерные транскрипционные факторы.

МУТАЦИИ С ПРИОБРЕТЕНИЕМ ФУНКЦИИ

Среди широкого спектра усиливающих функцию мутаций наиболее интересными с точки зрения клинической биохимии являются случаи, когда белок приобретает новую функцию. Вновь приобретенная функция может проявляться на таких уровнях, как взаимодействие фермента с новым субстратом, необратимая активация сигналпередающего белка или ионного канала, нарушение нормального процесса инактивации фермента, аномальная олигомеризация белка или синтез химерного белка.

Хорошим примером приобретения функции служит миссенс-мутация Ала₃₆₆–Сер в гене GNAS1, кодирующем α -субъеди-

ницу гетеротримерного GTP-связывающего белка Gs. Этот белок сопрягает 7-доменные трансмембранные рецепторы гормонов с аденилатциклазой. Мутация приводит к двоякому изменению свойств белка. Во-первых, ускоряется высвобождение GDP и, соответственно, повышается фракция GTP-связанного (активного) белка α_s , что приводит к конститутивной активации аденилатциклазы. Во-вторых, белок становится термолабильным при 37 °C. В связи с этим во всех органах, за исключением яичка, активность Gs снижается, что приводит к развитию наследственной остеодистрофии Олбрайта. А в яичке, где температура ниже, Gs белок необратимо активируется, что приводит к тестостоксикозу.

Наиболее частой причиной приобретения функции является повышенная экспрессия гена либо нарушение места или времени его экспрессии, что наиболее характерно для злокачественно трансформированных клеток.

Для мутаций с приобретением функции, как правило, характерен доминантный тип наследования. В тех редких случаях, когда мутации с приобретением функции находятся в гомозиготном состоянии, наблюдаются очень тяжелые формы заболеваний, часто с пренатальной летальностью. Примером может служить гомозиготная ахондроплазия — наиболее частая причина карликовости, которая вызывается мутациями в гене FGFR3, кодирующем рецептор фактора роста фибробластов. Делеции участка хромосомы, на котором располагается FGFR3, при других заболеваниях не приводят к аномалиям скелета, характерным для ахондроплазии, что позволяет предположить усиление или приобретение функции при этом заболевании. Ахондроплазия всегда встречается в гетерозиготной форме, поскольку гомозиготность по данному признаку летальна.

ПРИНЦИПЫ ПОИСКА МУТАЦИЙ

Общий подход к поиску мутаций в геномной ДНК человека базируется на ряде принципов.

Прежде всего, использование того или иного метода в ДНК-диагностике зависит от наличия информации о возможном типе мутации у данного пациента. В тех случаях, когда тип мутации неизвестен, применяются скрининговые методы, позволяющие обнаруживать любые отличия в нуклеотидной последовательно-

сти мутантного и нормального генов. Если же мутация известна, например уже идентифицирована у родственников, для обследования используются другие, более простые и одновременно более эффективные методы, которые можно назвать методами детекции известных мутаций.

Далее, независимо от направленности (скрининговый или детекционный) выбранного способа обязательно учитывают, что одна группа методов базируется на специфичности нуклеотидного спаривания при образовании двойной цепи ДНК, а другая — на узнавании последовательности ДНК ферментами.

Для первой группы методов в качестве референсной последовательности используются фрагменты последовательности изучаемого гена, соответствующей дикому типу, т. е. наиболее распространенной в популяции. Это может быть как короткий олигонуклеотидный праймер (около 20 нуклеотидов), так и более длинный фрагмент ДНК, используемый для гибридизации. В том случае, если ДНК больного содержит мутацию в участке, перекрываемом пробой, полноценная гибридизация между мутантным аллелем и пробой невозможна. Это приводит либо к отсутствию продукта полимеразной цепной реакции (ПЦР), либо к образованию неполноценного ДНК-дуплекса, содержащего участки неспаренных нуклеотидов, которые обнаруживаются различными химическими или ферментативными способами.

Классическим примером метода, основанного на узнавании последовательности ДНК ферментами, является использование рестриктаз — ферментов, расщепляющих ДНК в участках, содержащих строго индивидуальные последовательности длиной 4–8 нуклеотидов. Появление отклонений в нуклеотидной последовательности в результате мутации может приводить либо к утрате уже существующего сайта расщепления для какой-либо рестриктазы, либо, наоборот, к его появлению. В этой же группе методов используют ферменты ДНК-полимеразы. Эти ферменты синтезируют комплементарную цепь в точном соответствии с последовательностью одноцепочечной матрицы. Используя меченые нуклеотидные блоки, можно определить, в какой последовательности располагаются нуклеотиды в данной матрице. Такой принцип лежит в основе ферментативного секвенирования (определения нуклеотидной последовательности) по методу Сэнгера,

а также в его упрощенных вариантах, предназначенных для определения нуклеотидной последовательности коротких участков ДНК (минисеквенирование).

В подавляющем большинстве случаев перед собственно анализом мутаций изучаемый фрагмент генома пациента амплифицируется с помощью ПЦР. Целью ПЦР обычно является простое умножение числа копий данного фрагмента, что облегчает технически последующий анализ ДНК (рис. 4.3). В большинстве вариантов ПЦР у гетерозигот с одинаковой эффективностью амплифицируются и нормальный, и мутантный аллели, а их дискриминация осуществляется на последующих стадиях. Существует также аллель-специфическая ПЦР, при которой используются праймеры, гомологичные нормальному либо мутантному аллелю, что позволяет определить присутствие мутации уже на стадии ПЦР по наличию или отсутствию продукта амплификации.

Другой универсальный метод, широко применяемый для диагностики мутаций, — секвенирование ДНК. Секвенирование применяется как для поиска неизвестных мутаций, так и для подтверждения нарушений, обнаруженных другими методами. Существующие методы позволяют секвенировать непосредственно продукты ПЦР, минуя стадию клонирования ПЦР-фрагмента в бактериях. Достоинством секвенирования являются универсальность и высокая информативность. Главным ограничением данного метода является высокая стоимость, не позволяющая использовать его в качестве основного при поиске мутаций.

Количество существующих методов анализа мутаций чрезвычайно велико, а их описание без преувеличения потребует отдельной книги. Ниже приведены описания лишь тех методов, которые лучше приспособлены к использованию в клинической практике, т. е. отвечающих следующим требованиям: достаточная чувствительность выявления мутаций, хорошая воспроизводимость, невысокая стоимость и возможность автоматизации.

МЕТОДЫ МУТАЦИОННОГО СКРИНИНГА

Методы мутационного скрининга применяются в тех случаях, когда характер мутации неизвестен, а клиническая картина наследственного заболевания позволяет предположить, в каких именно генах могла произойти перестройка. Например, нали-

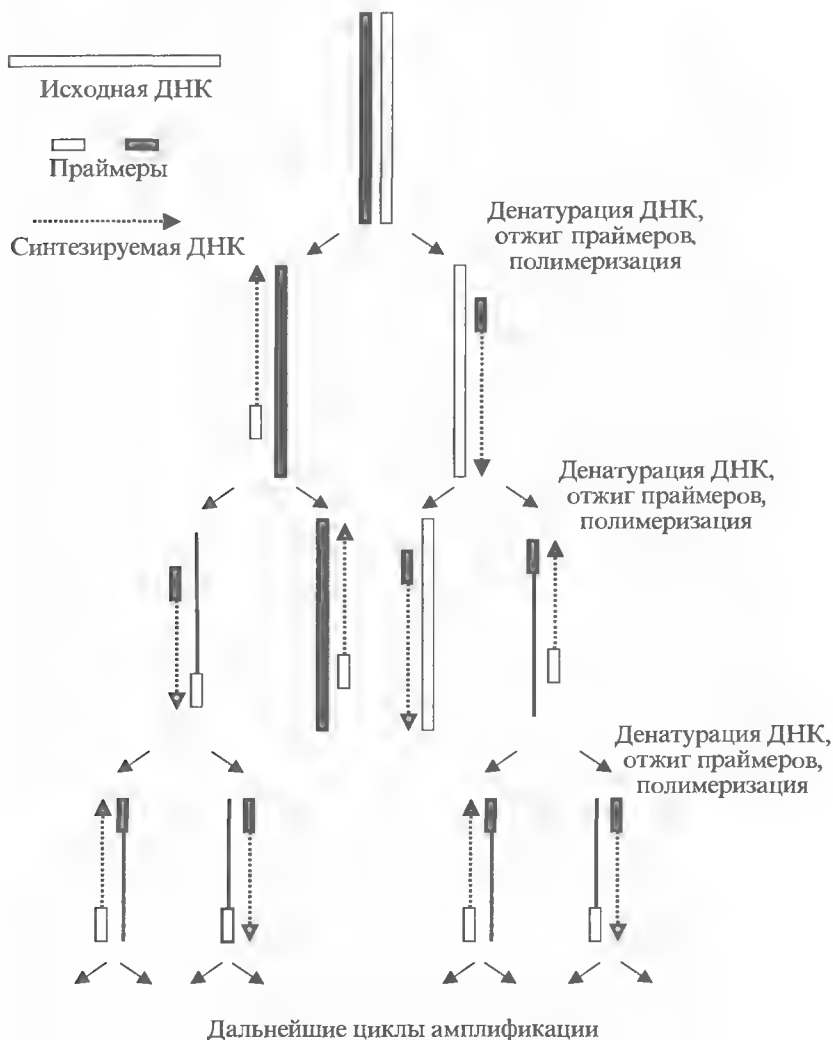


Рис. 4.3. Схема полимеразной цепной реакции.

чие гиперхолестеринемии IIa типа в сочетании с сухожильными ксантомами свидетельствует о наличии семейной гиперхолестеринемии и подсказывает, что мутацию следует искать в генах, связанных с захватом ЛПНП клетками, прежде всего в гене

рецептора ЛПНП. Поскольку мутации в этом гене при семейной гиперхолестеринемии очень разнообразны и могут затрагивать всю длину гена, необходимо анализировать большие участки ДНК. Секвенирование такого длинного фрагмента гена слишком дорого, поэтому применяют более простые методы.

АНАЛИЗ МАКРОПЕРЕСТРОЕК ДНК-БЛОТТИНГОМ

Для поиска макроперестроек ДНК используют блоттинг по Саузерну. При этом методе первоначально производят фрагментацию геномной ДНК с помощью рестриктазы, после чего полученные фрагменты ДНК разделяют по размеру электрофорезом в геле, денатурируют и переносят на нитроцеллюлозную мембрану. ДНК на полученном с геля отпечатке (блоте) инкубируют с меченым фрагментом исследуемого гена, который гибридизуется с теми фрагментами геномной ДНК, которые содержат данный ген. При наличии макроперестроек ДНК, затрагивающих данный ген, набор или размер фрагментов, с которыми гибридизуется меченая проба, будет отличаться от нормы.

ГЕТЕРОДУПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ

Поиск микроделений/инсерций размером менее 25 пар нуклеотидов, а также однонуклеотидных замен более сложен. Для их анализа часто используются специальные варианты электрофоретических методов. Одним из наиболее простых является гетеродуплексный анализ (рис. 4.4). В этом методе образец, содержащий смесь нормального (референсного) и исследуемого амплифицированного фрагмента ДНК, нагревается для денатурации ДНК, а потом охлаждается с восстановлением двухцепочечной структуры ДНК. Поскольку наличие небольших отличий в нуклеотидной последовательности не препятствует гибридизации, часть образующихся дуплексов состоит из референсной и исследуемой ДНК. В участках референсной и исследуемой ДНК, отличающихся по нуклеотидному составу, нормальное спаривание нуклеотидов невозможно и образуется так называемый мисмэтч. Двухцепочечная ДНК, имеющая в своей структуре мисмэтч, на электрофорезе мигрирует по-другому, чем полностью комплементарный дуплекс, что позволяет после окрашивания ДНК обнаруживать аномально мигрирующие фрагменты.

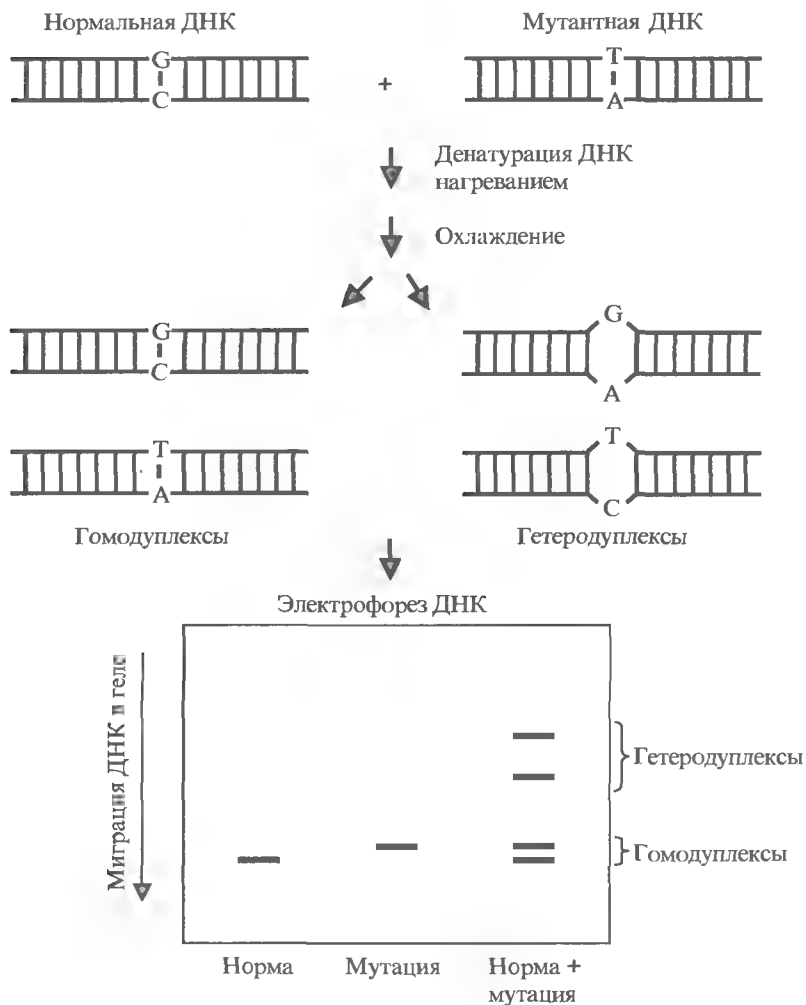


Рис. 4.4. Гетеродуплексный анализ.

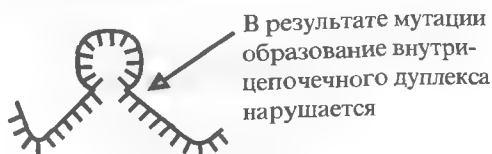
АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА КОНФОРМАЦИИ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

Другим популярным электрофоретическим методом мутационного скрининга является анализ полиморфизма конформации одноцепочечной ДНК (single strand conformation polymorphism —

SSCP). Принцип метода основан на том, что если денатурированную нагреванием ДНК резко охладить, будут преимущественно образовываться не двухцепочечные дуплексы, а короткие двухцепочечные участки внутри каждого одноцепочечного фрагмента ДНК (рис. 4.5). Обычно образуется несколько относительно

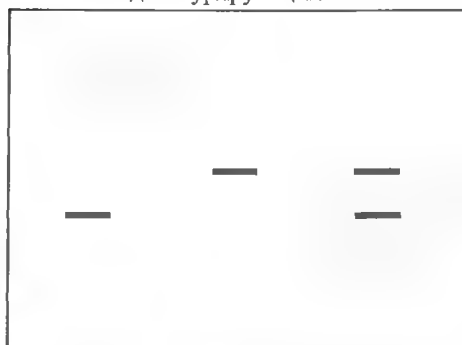
Нормальная ДНК

Мутантная ДНК



↓
Электрофорез ДНК
в неденатурирующем геле

Миграция ДНК в геле
↓



Норма

Мутация

Норма +
мутация

Рис. 4.5. Анализ полиморфизма конформации одноцепочечной ДНК.

устойчивых вариантов, которые в силу различной пространственной конформации по-разному мигрируют на электрофорезе. Участки внутрицепочечной комплементарности обычно короткие, и любое их изменение в результате даже однонуклеотидной замены обычно приводит к исчезновению данной формы внутрицепочечного дуплекса. В результате на электрофореграмме

изменяются распределение и интенсивность полос одноцепочечной ДНК. Данный метод ничего не говорит о природе отличий в нуклеотидной последовательности, поэтому аномальные образцы необходимо секвенировать.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК В ГРАДИЕНТЕ ДЕНАТУРАНТА

Более воспроизводимым и информативным по сравнению с SSCP является электрофоретический анализ ДНК в градиенте денатуранта (рис. 4.6). Очевидно, что любая нуклеотидная заме-

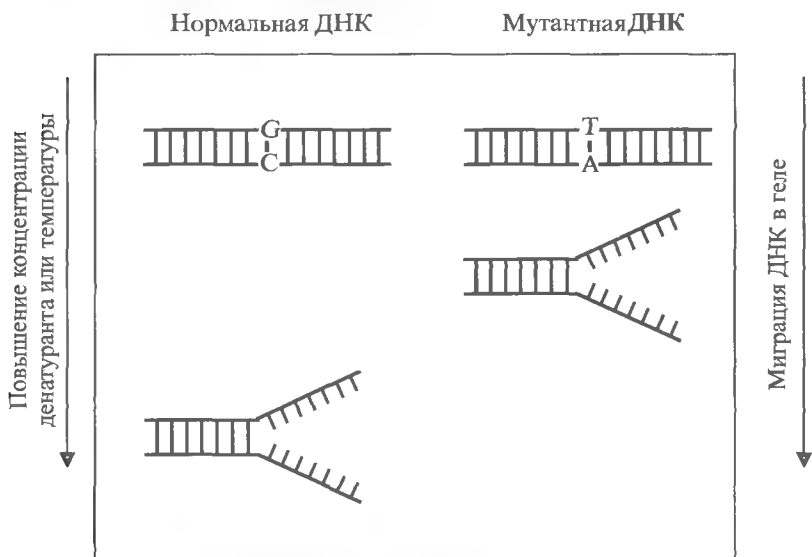


Рис. 4.6. Электрофорез в градиенте денатуранта.

на приведет к изменению прочности дуплекса ДНК, и он будет денатурировать на одиночные цепи при аномальной температуре или концентрации денатурирующего агента по сравнению с нормальной последовательностью. В данном методе электрофорез проводят в полиакриламидных гелях, содержащих в нижней части более высокую концентрацию денатуранта, чем в верхней. В ходе электрофореза нормальный и мутантный фрагменты ДНК денатурируют в разных участках геля. Так как подвижность

образующихся одиночных цепей много ниже, чем двухцепочечной ДНК (вследствие конформационных особенностей одноцепочечной ДНК), денатурированный фрагмент резко замедляет миграцию, в то время как двухцепочечный продолжает свое движение. В результате нормальные и мутантные фрагменты ДНК мигрируют в геле на разное расстояние. Иногда в качестве денатуранта используют не химическое вещество, а градиент температуры.

ДЕНАТУРИРУЮЩАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Различия в прочности нормального и мутантного дуплексов можно также обнаружить с помощью денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии. В этом методе фрагмент ДНК аналогично описанным выше электрофоретическим методам подвергается воздействию градиента денатурирующих агентов, но анализ ДНК проводится хроматографическим методом с использованием спектрофотометрической детекции. Данный метод высокочувствителен и легко автоматизируется, в связи с чем он все шире используется для клинической ДНК-диагностики.

ХИМИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ НЕСПАРЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Вторая группа методов основана на детекции мутаций с помощью ферментов или химической обработки, специфически разрушающей участки некомплементарного спаривания.

Исследуемый фрагмент ДНК денатурируют, смешивают с контрольным образцом, содержащим нормальную ДНК, и охлаждают для образования дуплексов, некоторые из которых при наличии у пациента мутации будут содержать участки неспаренных оснований. Обработка гетеродуплекса ДНК гидроксиламином или тетроксидом осмия приводит к модификации неспаренных нуклеотидов, содержащих цитозин и тимидин. Последующая обработка пиперидином приводит к расщеплению ДНК по данному нуклеотиду. В результате в нормальных образцах размер ДНК сохраняется, а мутантные содержат набор фрагментов, соответствующих мутациям, затрагивающим нуклеотиды С или Т. Данный метод не получил широкого применения, вероятно, вследствие высокой токсичности применяемых реагентов.

ЗАЩИТА ОТ РНКАЗЫ

В другом методе наличие неспаренных нуклеотидов определяется с помощью фермента РНКаза. В этом методе используется меченая РНК-проба, соответствующая нормальной последовательности гена, которая гибридизуется с исследуемым фрагментом ДНК (рис. 4.7). В составе ДНК/РНК-дуплекса РНК устойчива к действию РНКаза, поэтому данный метод называют защитой от РНКаза. Однако в участках, различных по нуклеотидной последовательности между пробой и анализируемым образцом спаривания нуклеотидов не происходит. Образование фрагментов РНК регистрируется с помощью электрофореза. Данный метод является одним из наиболее чувствительных и специфичных для скрининга мутаций, но не получил широкого распространения, видимо, из-за неудобства работы с лабильными РНК-пробами. Существуют и другие методы, основанные на узнавании ферментами неспаренных оснований; пока неясно, насколько широко они будут применяться в клинической диагностике.

СКРИНИНГ МУТАЦИЙ В ДИАГНОСТИКЕ

Электрофоретические методы мутационного скрининга обладают неабсолютной чувствительностью, обычно они позволяют обнаруживать лишь около половины мутаций и полиморфизмов в анализируемых фрагментах, и лишь чувствительность денатурирующего электрофореза приближается к 100%. В сочетании с относительно невысокой стоимостью и возможностью автоматизации это делает данный метод все более популярным.

Еще одна особенность скрининговых методов состоит в том, что при положительных результатах требуется дополнительное секвенирование или рестриктазный анализ, поскольку скрининговые методы не дают никакой информации о характере нуклеотидных отличий. При проведении ДНК-диагностики недостаточно обнаружить у пациента отклонение в нуклеотидной последовательности, приводящее к замене кодируемой аминокислоты. Нужно подтвердить, что эта аминокислотная замена функционально значима. Прямой метод заключается в получении рекомбинантного мутантного белка и определении его активности. Этот трудоемкий и дорогостоящий подход используется

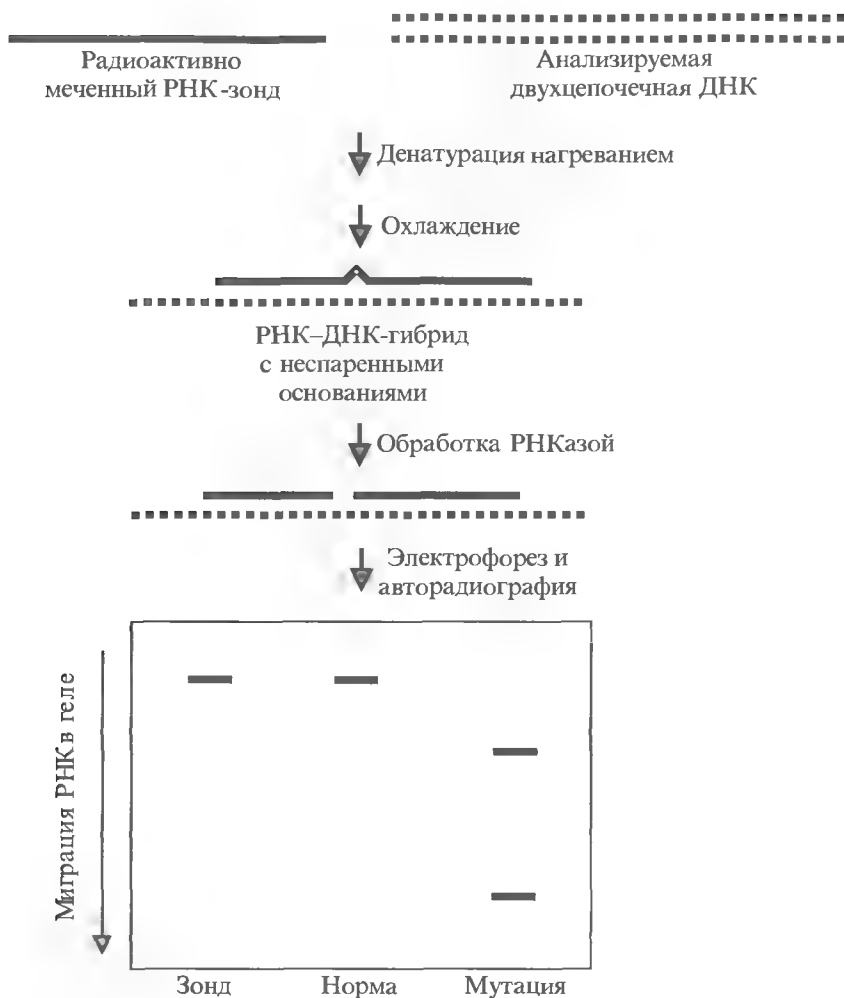


Рис. 4.7. Метод защиты от РНКазы.

главным образом в исследовательских целях. На практике чаще ориентируются на тип аминокислотной замены. В том случае, если нормальная и мутантная аминокислоты принадлежат к разным структурным классам, вероятность функциональных изменений в белке более высока. Вероятность нарушения функции белка еще выше, если мутация затрагивает эволюционно кон-

сервативные участки гена, т.е. те положения, в которых одна и та же аминокислота присутствует у нескольких видов млекопитающих. Наличие таких участков обычно оказывает влияние на синтез, транспорт или функционирование белка, и любое изменение в них отражается на активности белка. Например, анализ последовательностей гена ЛПНП-рецептора китайского хомячка, кролика, крысы, мыши и *Xenopus laevis* продемонстрировал соответственно 81, 79, 77, 76 и 70% гомологичность рецептору человека. Доступная через Интернет база данных UMD-LDLR содержит ряд программ для анализа мутаций в гене ЛПНП-рецептора и в том числе дает возможность анализировать консервативность каждого участка гена.

Дополнительную информацию о патогенности мутации можно получить, обследуя родственников больного. В том случае, если эта же мутация присутствует у родственников больного, имеющих признаки данного заболевания (например, повышенный уровень холестерина при семейной гиперхолестеринемии), но отсутствует у здоровых лиц (обычно проводится скрининг более 100 доноров без признаков данного заболевания), вероятность того, что данная мутация является патогенной, очень высока.

В целом, несмотря на неабсолютную чувствительность методов скрининга мутаций, соотношение между информативностью и стоимостью данных методов достаточно высоко и они широко используются на практике. Следует, однако, иметь в виду, что их отрицательная предсказательная сила невелика. Другими словами, отсутствие каких-либо особенностей образца ДНК при анализе скрининговыми методами не означает, что эта ДНК не содержит мутаций.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ

В том случае, когда возможные варианты генетических перестроек известны и их не очень много, можно использовать методы, более быстрые и дешевые по сравнению с методами мутационного скрининга. Эти методы основаны либо на проведении ДНК-гибридизации, либо на способности ферментов-рестриктаз распознавать строго определенные нуклеотидные последователь-

ности или ДНК-полимераз синтезировать ДНК, комплементарную матрице (минисеквенирование).

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Наиболее простым методом детекции мутаций является рестрикционный анализ (рис. 4.8). Основой данного метода является очень высокая специфичность рестрикционных эндонуклеаз

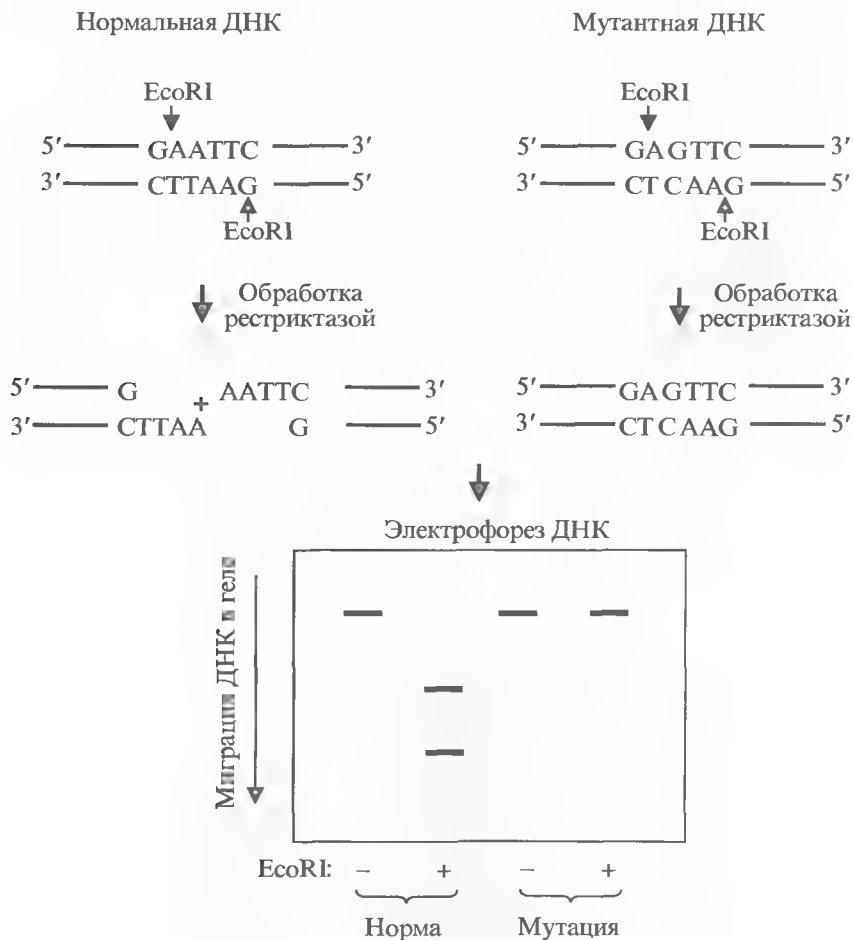


Рис. 4.8. Рестрикционный анализ.

в отношении определенных нуклеотидных последовательностей. Каждый из этих бактериальных ферментов узнает строго индивидуальную последовательность из 4–8 нуклеотидов и разрезает двойную цепь ДНК внутри или рядом с этим участком. Достаточно замены одного нуклеотида, чтобы нарушить рестрикцию данным ферментом. В тех случаях, когда полиморфный нуклеотид входит в состав сайта рестрикции, его можно со 100% надежностью генотипировать с помощью рестриктазы. Нуклеотидные замены чаще всего нарушают существующие сайты рестрикции, но иногда создают новые сайты. Недостатком метода является то, что полиморфные нуклеотиды не всегда лежат в участках узнавания какой-либо рестриктазы. Частичное решение возможно в тех случаях, когда участок, в котором располагается мутация, содержит хотя бы часть нуклеотидов, составляющих сайт рестрикции. Полноценный участок рестрикции можно создать искусственно в ходе ПЦР. Для этого используют праймеры, не полностью соответствующие последовательности нуклеотидов в районе мутации, а содержащие 1–2 некомплементарных нуклеотида, дополняющих сайт рестрикции, в который будет входить и полиморфный нуклеотид. Обычно введение небольшого числа некомплементарных оснований несильно снижает эффективность ПЦР, поэтому после амплификации в продукте появляется новый сайт рестрикции, в котором участвует и полиморфный нуклеотид. Дальнейший рестрикционный анализ проводится так же, как в стандартном методе.

АЛЛЕЛЬСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПЦР

В некоторых случаях ПЦР можно использовать не для обогащения исследуемого фрагмента геномной ДНК, а для непосредственного обнаружения мутации (рис. 4.9). В этом варианте один из праймеров гибридизуется с участком ДНК, внутри которого расположен полиморфный нуклеотид. Температуру отжига праймеров подбирают так, чтобы связывание праймера и последующая амплификация проходили только при полном совпадении последовательностей ДНК и праймера. Например, при связывании праймера, соответствующего мутантной последовательности, с нормальной ДНК образуется неспаренный нуклеотид, сни-

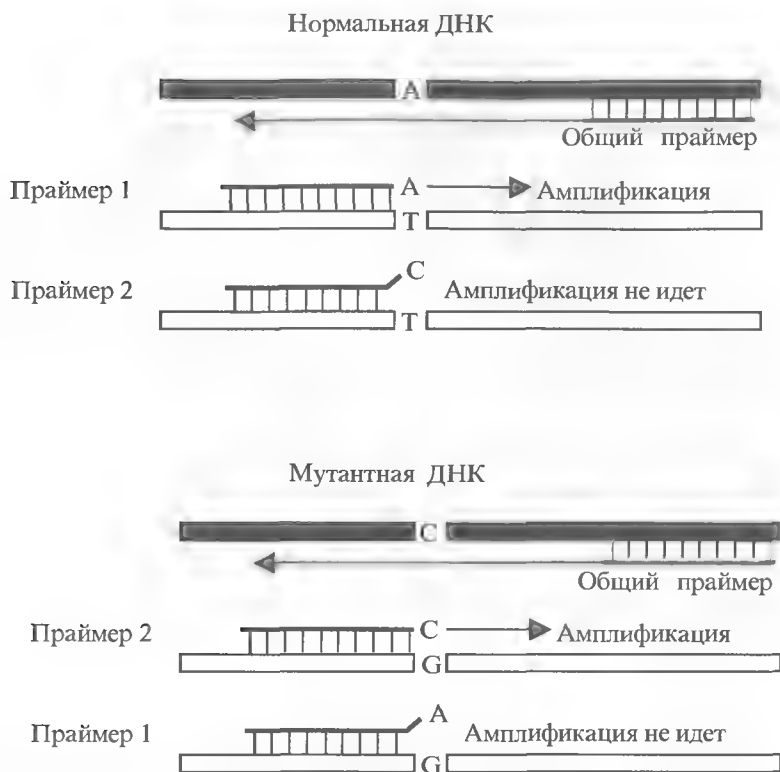


Рис. 4.9. Аллельспецифическая полимеразная цепная реакция.

жающий прочность связывания праймера с ДНК. При достаточно высокой температуре отжига праймер вообще перестает связываться с нормальным аллелем, ПЦР не идет и продукт не накапливается. Обычно параллельно ставят реакцию с праймером, соответствующим нормальному аллелю. Эта реакция служит положительным контролем, показывающим нормальный ход амплификации. Поскольку наличие одного мисмэтча может несильно снижать прочность связывания праймера с ДНК, иногда в последовательность праймера вводят второй мисмэтч с целью еще больше дестабилизировать дуплекс и снизить выход продукта при наличии неспаренного нуклеотида в полиморфном участке.

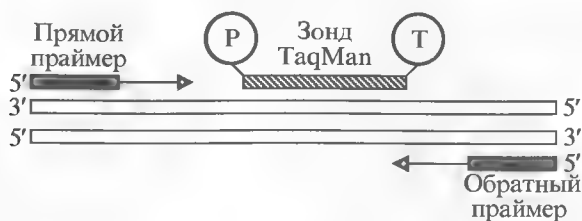
ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Достоинством описанного выше метода аллельспецифической ПЦР является уменьшение числа стадий в процедуре анализа, поскольку при этом не требуется обработки продукта рестриктазами или применения сложных электрофоретических методов. Еще больше метод ускоряется при использовании ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). В этом методе образование продукта отслеживается не с помощью электрофореза, как в стандартном методе ПЦР, а непосредственно в ходе ПЦР по накоплению в реакционной среде двухцепочечной ДНК. Накопление ДНК определяется после каждого цикла полимеризации по увеличению флуоресценции красителя SYBR Green или его аналогов, флуоресценция которых резко усиливается при взаимодействии с двухцепочечной ДНК, но не зависит от присутствия нуклеотидов или праймеров. Приборы для РВ-ПЦР представляют собой комбинацию ПЦР-амплификатора и флуориметра. После завершения амплификации специфичность полученного продукта можно определить с помощью измерения температуры плавления, которая мониторируется по снижению флуоресценции SYBR Green.

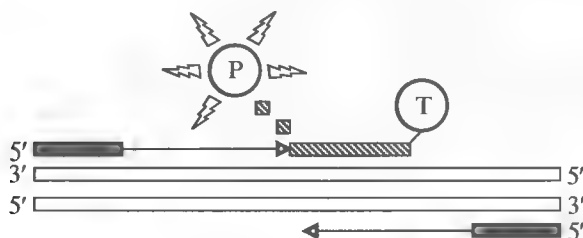
ПРОБЫ TAQMAN

Существуют и другие способы регистрации продукта ПЦР непосредственно в реакционной смеси без проведения электрофореза. Метод, запатентованный фирмой Hoffmann LaRoche, основан на детекции амплифицированной ДНК с помощью олигонуклеотидного зонда, гибридизующегося с центральной частью амплифицированной последовательности. На концах олигонуклеотидных проб, получивших название TaqMan, расположены нуклеотиды, меченные 2 разными флуоресцентными красителями, один из которых тушит флуоресценцию другого. В результате тушения уровень флуоресценции второго красителя невелик. Taq-полимераза, достраивающая новую цепь с одного из праймеров, за счет своей экзонуклеазной активности расщепляет TaqMan-пробу, связавшуюся с серединой амплифицируемого участка ДНК, в результате чего флуоресцентно меченные нуклеотиды высвобождаются в раствор и эффект тушения исчезает, поскольку он наблюдается только в том случае, когда

Стадия 1: начало полимеризации



Стадия 2: продолжение полимеризации и расщепление зонда



Стадия 3: завершение полимеризации

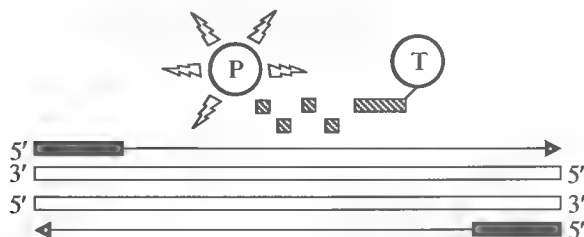


Рис. 4.10. Зонды TaqMan. P — репортерный краситель, T — тушитель флюоресценции.

флюорофоры расположены близко друг от друга. В результате флюоресценция красителя возрастает тем сильнее, чем больше олигонуклеотидной пробы было разрушено ДНК-полимеразой в ходе амплификации, т.е. чем больше продукта образовалось. Этот метод применяется и для анализа мутаций. Для этого

используются 2 TaqMan-пробы, меченные разными парами флюорофоров и отличающиеся по нуклеотидной последовательности в полиморфном участке, одна из которых соответствует дикому типу, другая — мутантному. Деградация проб ДНК-полимеразой проводится при температуре, при которой сохраняются только полностью комплементарные комплексы между анализируемым фрагментом и пробами. По увеличению флюоресценции красителей, входящих в состав нормальной или мутантной пробы, можно определить, какие варианты присутствуют в анализируемом образце. Данный метод позволяет надежно различать гетеро- и гомозиготных носителей мутаций.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БАКЕНЫ

Еще один способ детекции мутаций, основанный на эффекте тушения флюоресценции, реализуется в методе молекулярных бакенов (рис. 4.11). Бакеном называется олигонуклеотид, 3'- и

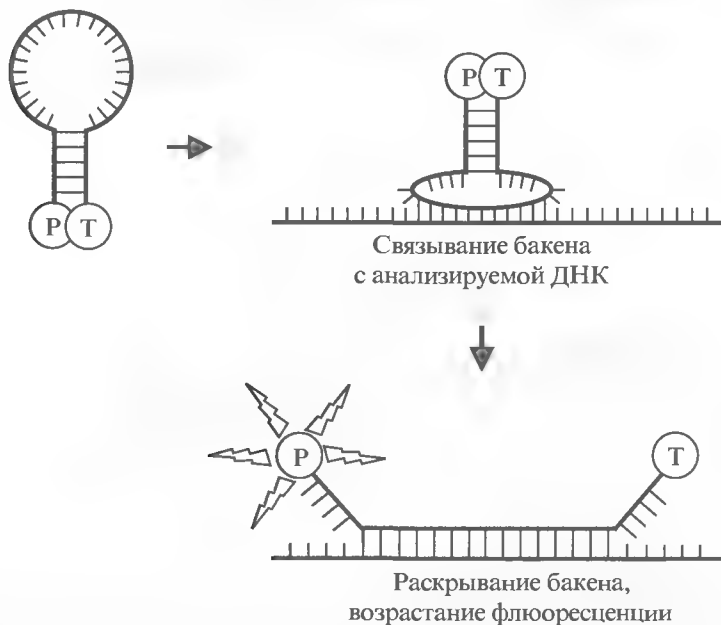


Рис. 4.11. Метод молекулярных бакенов. Р — репортерный краситель, Т — тушитель флюоресценции.

5'-концы которого помечены 2 красителями, один из которых выступает в качестве тушителя. В отличие от проб TaqMap бакены длиннее и содержат около концов короткие комплементарные друг другу участки, которые при обычной температуре отжигаются друг на друга с образованием шпильки структуры. При этом расположенные на концах олигонуклеотида красители сближаются и происходит тушение флюоресценции одного красителя другим. В середине бакена последовательность нуклеотидов соответствует изучаемому участку ДНК. После денатурации нагреванием, приводящей к плавлению участка шпильки, смесь ДНК с бакенами охлаждается, что дает возможность образования дуплекса бакена с анализируемой ДНК. При дальнейшем охлаждении в свободных бакенах вновь образуются шпильки и флюоресценция снижается. В отличие от этого в бакенах, связавшихся с анализируемой ДНК, красители остаются на удалении друг от друга и их флюоресценция сохраняется на высоком уровне. Гибридизация исследуемой ДНК с бакенами, содержащими в центральной части нормальную или мутантную последовательность нуклеотидов, позволяет определить генотип исследуемой ДНК.

ГИБРИДИЗАЦИЯ С АЛЛЕЛЬСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

Данный метод основан на гибридизации исследуемой ДНК с олигонуклеотидами, гомологичными участку мутации и окружающей его последовательности. Данный метод существует в 2 формах. Иногда на твердой основе иммобилизуют анализируемый продукт ПЦР, а меченые олигонуклеотиды добавляют в растворе. Условия отмывки подбираются таким образом, чтобы дуплексы, содержащие неспаренные основания, разрушились. В результате на матрице остаются только олигонуклеотиды, на 100% комплементарные анализируемой ДНК. Добавляя олигонуклеотиды, соответствующие по последовательности нормальному либо мутантному варианту, можно определить, какой именно нуклеотид присутствует в анализируемой ДНК. Во втором варианте данного метода на матрице иммобилизуются олигонуклеотиды, с которыми гибридизуется меченый продукт ПЦР.

Достоинством метода гибридизации с олигонуклеотидами является возможность его миниатюризации, когда широкий набор олигонуклеотидов иммобилизуется на микрочипе, что позволяет одновременно детектировать множество мутаций. Основной сложностью данного метода является необходимость строгого подбора условий гибридизации и отмывки не полностью комплементарной ДНК. Пока неясно, насколько широко этот метод будет применяться в практической ДНК-диагностике.

АЛЛЕЛЬСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛИГАЗНАЯ РЕАКЦИЯ

Эффективным методом обнаружения однонуклеотидных замен и коротких перестроек является лигазная реакция (рис. 4.12). Анализируемая ДНК гибридизуется с 2 олигонуклеотидами, один из которых заканчивается нуклеотидом, комплементарным полиморфному сайту, а второй непосредственно прилегает к нему. После окончания гибридизации фермент ДНК-лигаза сшивает олигонуклеотиды с образованием более длинного фрагмента, который сильно отличается от исходных олигонуклеотидов по подвижности при электрофорезе. Если же олигонуклеотиды не полностью комплементарны фрагменту ДНК и после гибридизации в полиморфном участке образуется неспаренный нуклеотид, лигаза не сшивает такие олигонуклеотиды и длинный фрагмент не образуется. Таким образом, проводя лигазную реакцию с одной общей и одной из 2 аллельспецифических проб, можно генотипировать образец ДНК по данному нуклеотиду.

МИНИСЕКВЕНИРОВАНИЕ

В этом методе ПЦР-продукт гибридизуется с олигонуклеотидом, связывающимся с 5'-стороны от участка полиморфизма (рис. 4.13). После проведения гибридизации в реакционную смесь добавляется ДНК-полимераза и один из 4 модифицированных нуклеотидов. В этой реакции используются флюоресцентно меченные дидезоксинуклеотиды, в результате чего ДНК-полимераза может достроить лишь один нуклеотид, комплементарный тому, который располагается в анализируемом положении. Поэтому реакция пройдет только в той пробирке, куда добавлен нуклеотид, комплементарный анализируемому. В ряде случаев в реакционной смеси присутствуют все 4 нуклеотида, но мечен-

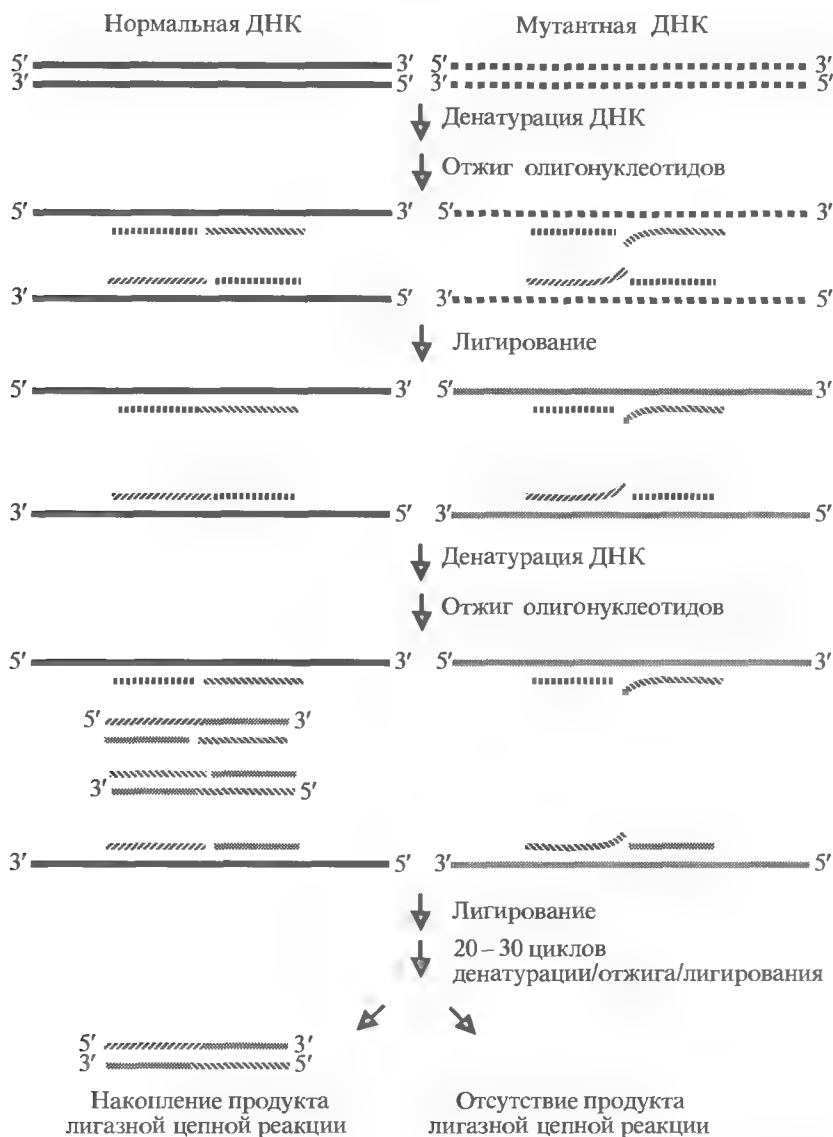


Рис. 4.12. Аллельспецифическая лигазная реакция.

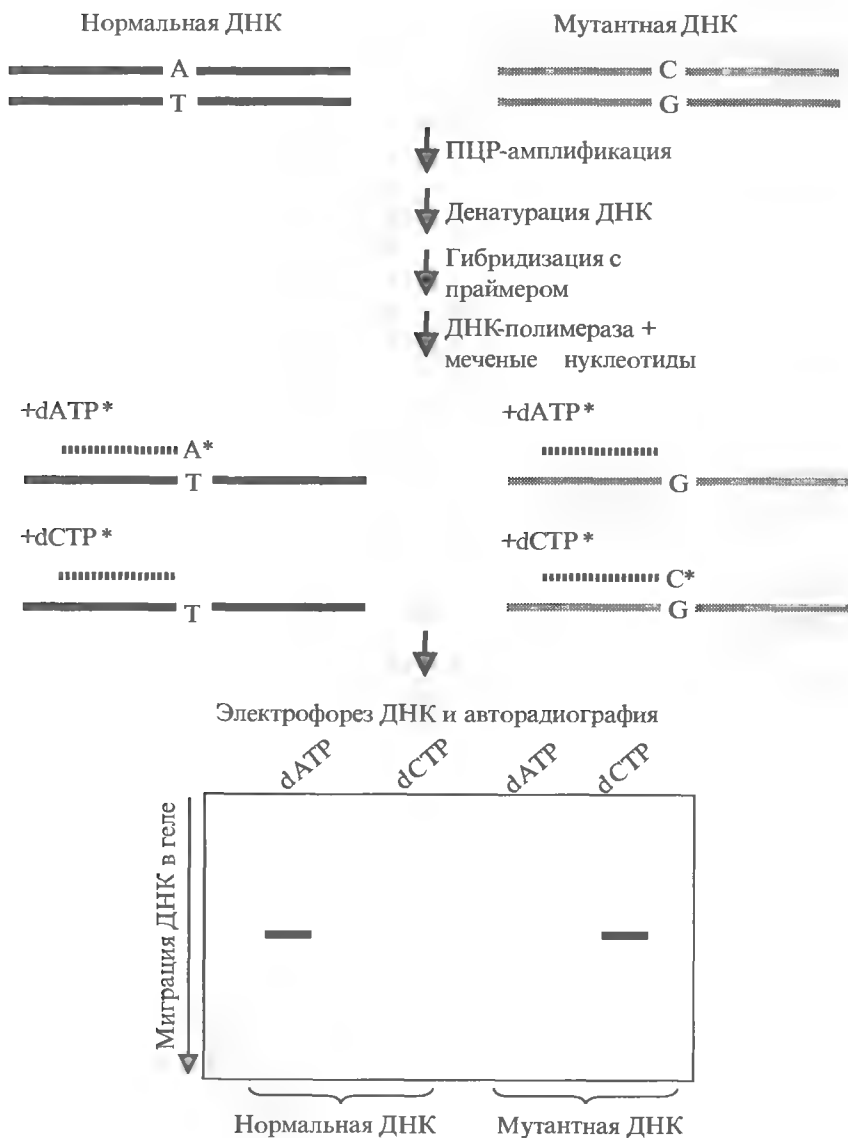


Рис. 4.13. Минисеквенирование.

ные разными красителями. Анализ флюоресценции на 4 длинах волн позволяет установить, какой нуклеотид включился и соответственно комплементарный ему анализируемый нуклеотид. Поскольку в данной методике используется тот же принцип, что в ферментативном секвенировании ДНК, его часто называют минисеквенированием.

ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЕ

Известны и другие методы определения мутаций, основанные на активности ДНК-полимеразы. В одном из них, получившем название пиросеквенирования, каждый шаг удлинения цепи ДНК-полимеразой регистрируется по образованию пирофосфата, который мониторируется с помощью сопряженных ферментативных реакций, приводящих в ответ на образование пирофосфата к вспышке хемилюминесценции (рис. 4.14). Данный метод позво-

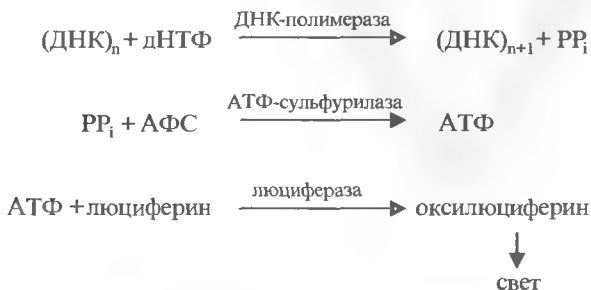


Рис. 4.14. Принцип пиросеквенирования ДНК.

ляет секвенировать лишь очень короткие участки ДНК, поэтому его основное применение заключается в анализе мутаций. Анализируемый нуклеотид идентифицируется по тому, добавление какого из 4 нуклеотидов (в этом методе используются обычные нуклеотиды) привело к вспышке хемилюминесценции.

ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ В ДИАГНОСТИКЕ

При правильном использовании методы детекции определяют наличие или отсутствие мутаций с очень высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет использовать полученную этими методами информацию для принятия очень важных решений, например о необходимости прерывания беременности при проведении пренатальной диагностики.

Существуют два метода пренатальной диагностики. Амниоцентез заключается в отборе около 10 мл амниотической жидкости через брюшную стенку (рис. 4.15). Оптимальный срок проведения — 16-я неделя беременности. Из жидкости центри-



Рис. 4.15. Амниоцентез.

фугированием выделяют клетки плода и либо сразу анализируют их с помощью ПЦР, либо помещают в культуру. Клетки в культуре делятся, и через какое-то время их хватает для проведения хромосомного анализа, а позднее — биохимического. Второй метод — биопсия ворсин хориона — возможен на более ранних сроках беременности — на 10–12-й неделе (рис. 4.16). Эта процедура заключается в трансабдоминальной или трансцервикальной биопсии ворсин хориона. Клетки хориона можно культивировать либо анализировать сразу, если материала хватает для проведения ДНК-анализа. В случае обнаружения хромосомных аномалий либо мутаций беременность по желанию родителей можно прервать.

Проведение пренатальной диагностики мутаций имеет смысл при наличии надежного метода детекции той мутации, которая присутствует в данной семье. В некоторых случаях можно

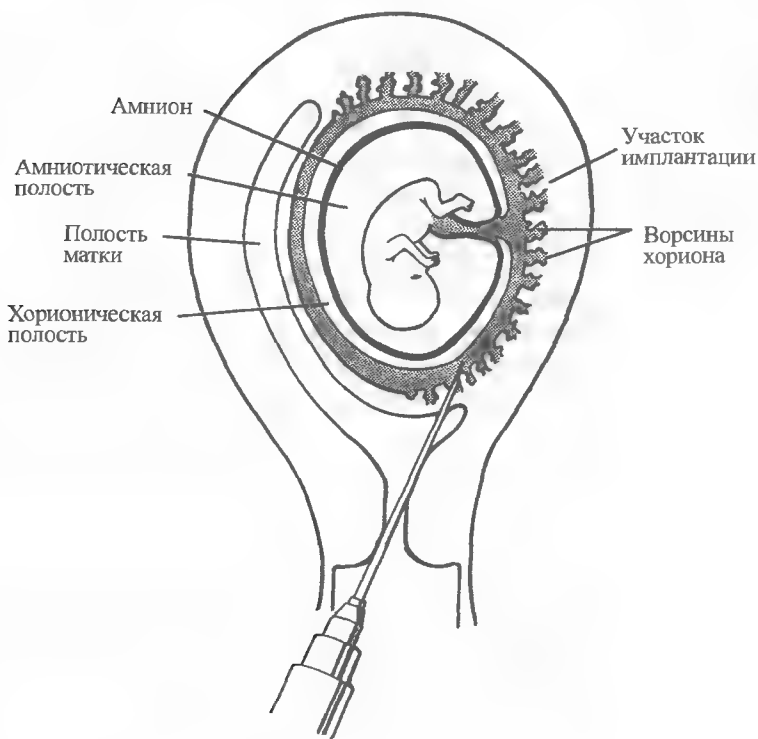


Рис. 4.16. Взятие биопсии хориона.

определить, унаследовал ли плод наследственное заболевание, не зная точной локализации мутации, а опираясь на анализ генетического сцепления болезни в данной семье. Однако это не всегда возможно, поскольку для анализа сцепления требуются образцы ДНК нескольких больных родственников и большого количества здоровых членов семьи.

4.5.2. ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДНК-ДИАГНОСТИКИ

Максимальная диагностическая ценность генетического тестирования наблюдается в тех случаях, когда имеется высокая корреляция между наличием генетического дефекта и вероятностью развития патологии, т. е. для болезней с высокой пенетрантностью.

Такие заболевания испытывают постоянное давление естественного отбора, вследствие чего их частота в общей популяции обычно невелика. В связи с этим большинство применяемых генетических тестов связаны с диагностикой редких форм заболеваний. Даже самые частые формы моногенных заболеваний человека, описанные ниже, клинически проявляются не чаще, чем у одного человека из нескольких сотен.

Распространенные заболевания человека, такие, как гипертензия, диабет, сердечно-сосудистые заболевания, хотя и зависят от генетических факторов, но имеют невысокую пенетрантность, сложную, вариабельную и малоизученную генетическую структуру, поэтому, несмотря на несомненную необходимость поисков генетической предрасположенности к распространенным заболеваниям, результаты таких исследований на практике применяются очень ограниченно.

ФАКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Соотношение информативности результатов ДНК-диагностики и затрат на ее проведение в большой степени определяется генетической сложностью заболевания. В качестве примеров можно привести гемохроматоз, при котором 2 мутации вызывают практически все клинические случаи среди белого населения, и семейную гиперхолестеринемию, которую могут вызывать более 800 мутаций в гене ЛПНП-рецептора, ни одна из которых не встречается чаще, чем у 1% больных с семейной гиперхолестеринемией. Большинство наследственных заболеваний занимает промежуточное положение в этом диапазоне, приближаясь к семейной гиперхолестеринемии, когда затраты на проведение ДНК-диагностики могут лимитировать ее проведение.

При определенных условиях сложность диагностики и, соответственно, ее стоимость могут снижаться. Это возможно в группах населения, в которых генетическая структура какого-либо заболевания более проста, чем в остальных популяциях. Данный эффект наиболее выражен в популяциях с так называемым эффектом основателя. Этот генетический термин обозначает, что значительная часть популяции унаследовала от одного из своих предков-основателей определенную мутацию. В силу этого чисто случайного события в данной популяции бóльшая часть случаев

данного заболевания вызывается именно этой мутацией. Характерный пример, имеющий отношение к генетическому тестированию, — популяция африканеров, жителей Южной Африки североафриканского происхождения. Современные африканеры являются потомками небольшого числа семей из Голландии, переселившихся в XVII–XVIII веке в Африку. Среди африканеров семейная гиперхолестеринемия, ведущая к раннему развитию ИБС, встречается в несколько раз чаще, чем в европейской или американской популяции. Кроме того, подавляющее большинство (> 95%) случаев семейной гиперхолестеринемии в южноафриканской белой популяции связано с наличием одной из всего 3 мутаций в рецепторе ЛПНП. Такая генетическая однородность резко контрастирует с генетической структурой семейной гиперхолестеринемии в других странах, где описаны многие сотни мутаций, ни одна из которых не встречается чаще чем у 1–2% больных. По-видимому, несколько семей переселенцев (не менее 3) имели мутации, называемые теперь африканерскими, которые и стали основной причиной семейной гиперхолестеринемии у их потомков. С точки зрения практической медицины молекулярно-генетическое тестирование белых жителей Южной Африки на наличие семейной гиперхолестеринемии является достаточно эффективным и относительно недорогим подходом, позволяющим проводить пресимптоматическую диагностику этого заболевания. В отличие от Южной Африки в других странах для постановки такого диагноза требуется гораздо более дорогостоящий арсенал молекулярных методов.

Для других наследственных заболеваний также характерна разница в частоте мутаций между популяциями. Например, миссенс-мутация Цис₂₈₂–Тир в гене HFE, приводящая к развитию гемохроматоза, довольно часто встречается в европейских популяциях, где частота ее носителей составляет до 10–15%. В отличие от этого в африканских, азиатских популяциях и популяции австралийских аборигенов эта мутация встречается очень редко. Предполагается, что мутация Цис₂₈₂–Тир возникла в Европе около 2000 лет назад.

Помимо наличия эффекта основателя, второй биологический механизм, упрощающий поиск мутаций даже в генетически открытой популяции, — наличие в генах горячих мутационных то-

чек. Доказано, что вероятность возникновения мутаций отличается в участках генома с разным содержанием GC-нуклеотидов. Известна также последовательность, на которой происходит остановка ДНК-полимеразы α ; в таких районах в самых разных генах часто встречаются спорадические делеции. Вследствие этих факторов мутации распределяются не равномерно по длине гена, а концентрируются в определенных участках, что упрощает их поиск.

Таким образом, для эффективной ДНК-диагностики необходима информация о наиболее частых мутациях, приводящих к развитию данного заболевания в популяции, к которой принадлежит пациент.

ФАКТОРЫ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ

При ряде наследственных метаболических нарушений наличие заболевания можно заподозрить при проведении биохимического анализа. Например, у больных с семейной гиперхолестеринемией обычно повышен уровень холестерина ЛПНП, а при гемохроматозе увеличено насыщение трансферрина железом. Биохимические параметры подвержены вариабельности у каждого индивидуума. Вследствие этого лицам, например, с повышенным уровнем холестерина ЛПНП рекомендуется проведение повторных анализов с интервалом 3 мес, чтобы убедиться в достоверности обнаруженного метаболического отклонения. В ряде случаев биохимические показатели находятся в так называемой серой зоне, что еще больше затрудняет постановку диагноза. Здесь на помощь может прийти ДНК-диагностика. Наличие мутации показывает усредненную предрасположенность в течение всей жизни к сдвигу данного биохимического параметра в патологическую сторону, так сказать, патологическую готовность. В отличие от биохимического фенотипа генотип не подвержен индивидуальным и популяционным вариациям, свойственным биохимическим параметрам. Таким образом, ДНК-диагностика позволяет подтвердить биохимический диагноз независимым методом, а также исключить наличие других причин данного биохимического нарушения. Очевидно, что максимальная информативность ДНК-диагностики наследственных нарушений

метаболизма достигается при ее сочетании с классическими биохимическими методами.

При обсуждении специфичности и чувствительности методов ДНК-диагностики следует сначала определить, о чем идет речь — об определении конкретной мутации или о поиске неизвестного генетического нарушения у пациента. В случае определенной мутации, для которой разработаны надежные методы детекции, чувствительность и специфичность детекции близки к 100%. Для определения диагностической ценности суммарного молекулярно-генетического теста необходимо учитывать чувствительность обнаружения мутаций в сочетании с их пенетрантностью.

Положительная диагностическая ценность теста в значительной степени определяется пенетрантностью мутаций. Например, обнаружение трисомии по 21-й хромосоме либо мутаций, специфичных для миодистрофии Дюшенна или болезни Гентингтона, говорит о том, что у данных индивидуумов с вероятностью, близкой к 100%, имеется или разовьется в дальнейшем соответствующий клинический синдром. Однако столь высокая положительная диагностическая ценность характерна далеко не для всех генетических тестов. При низкой пенетрантности мутации, например, у носителей гемохроматозных мутаций, вероятность развития клинических проявлений не превышает нескольких процентов. В подобных случаях обнаружение дефекта свидетельствует лишь о предрасположенности к развитию данного заболевания, которая сильно зависит от наличия дополнительных наследственных факторов и факторов внешней среды.

Чем проще и чем более изучена генетическая структура данного заболевания, тем легче обнаружить мутацию и тем выше чувствительность теста. К сожалению, подавляющее большинство генетических заболеваний вызвано широким спектром мутаций, часто расположенных в разных генах. В сочетании с ограниченными возможностями современных молекулярных методов это снижает чувствительность молекулярно-генетического тестирования. Например, в настоящее время даже в лучших молекулярно-генетических лабораториях, работающих с пациентами с семейной гиперхолестеринемией, мутации удается выявить лишь у половины больных с верифицированным кли-

ническим диагнозом. Другим примером является миодистрофия Дюшенна. При этом заболевании делеции в гене дистрофина удается обнаружить лишь в 70% случаев, а остальным больным требуется дополнительный гистологический анализ мышечного биоптата. В тех случаях, когда тест не способен выявлять все генетические изменения, приводящие к данному заболеванию, его отрицательная предсказательная сила низка.

В определенных ситуациях отрицательная предсказательная сила ДНК-тестов может быть очень высокой. Речь идет о пренатальной и пресимптоматической диагностике в тех случаях, когда известны патогенные мутации, присутствующие у родителей. В такой ситуации высокая точность молекулярных методов позволяет с достаточной надежностью показать не только наличие, но и отсутствие родительских мутаций у плода или ребенка.

Подводя итог, можно сказать, что большинство молекулярно-генетических тестов обладает значительной положительной предсказательной силой, делающей целесообразным их применение в клинике, особенно в случае высокой пенетрантности и патогенности мутаций. В отличие от этого отрицательная предсказательная сила большинства молекулярных тестов невелика, за исключением тех случаев, когда известно, какие мутации были у родителей.

4.5.3. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДНК-ДИАГНОСТИКИ В КЛИНИКЕ

Как известно, классическая медицинская генетика описывает моногенные высокопенетрантные и клинически тяжелые заболевания. Частота таких заболеваний обычно не превышает 1 на 5000 населения. Около тысячи моногенных наследственных заболеваний можно выявлять с помощью анализа ДНК. Список тестов и выполняющих их лабораторий постоянно обновляется в Интернете (<http://www.geneclinics.org>). В основном ДНК-диагностику сейчас используют при генетическом консультировании и пренатальной диагностике с целью предотвращения рождения детей с патологией.

Однако, помимо классических моногенных случаев, в клинике часто встречаются наследственные заболевания, которые

характеризуются достаточно низкой пенетрантностью и относительно мягким течением. Традиционно их относили к моногенным, однако накопившиеся в последнее время данные больше указывают на олигогенный характер этих заболеваний.

Ниже подробно рассмотрено несколько распространенных олигогенных заболеваний человека, таких, как гемохроматоз, наследственные тромбофилии, семейная гиперхолестеринемия, кистозный фиброз и гипертрофическая кардиомиопатия. Гетерозиготные носители мутаций, приводящих к этим заболеваниям, в популяции встречаются с частотой от 1 на 500 до 1 на 20 человек. Вследствие высокой популяционной частоты заболевания этой группы вносят заметный суммарный вклад в патологию человека, вероятно, превышающий вклад редких наследственных заболеваний. Для всех перечисленных заболеваний ДНК-тестирование дает возможность пресимптоматической диагностики, а для гемохроматоза, тромбофилий и гиперхолестеринемии — и последующей профилактики, как фармакологической, так и путем изменения стиля жизни.

4.5.3.1. Гемохроматоз

Это одно из самых частых генетических нарушений обмена веществ, называемых также врожденными ошибками метаболизма. Гемохроматоз (ГХ) встречается у 1 из 200–300 лиц в Северной Европе.

Классическая триада — диабет, цирроз и пигментация кожи («бронзовый диабет») — была описана еще в 1865 г., а в 1935 г. был доказан семейный характер этого заболевания. В основе клинических проявлений ГХ лежит биохимический дефект — избыточное накопление железа в паренхимальных клетках печени, поджелудочной железы, сердца и передней доли гипофиза. Предотвратить развитие клинических проявлений можно с помощью очень простого и одновременно эффективного способа — профилактических флеботомий. Промежуточным фенотипом ГХ является повышенное содержание железа в плазме и печени, которое оценивается разными биохимическими тестами, такими, как насыщение трансферрина железом, концентрация ферритина и содержание железа в печени.

Клинические проявления ГХ очень разнообразны. Одним из наиболее частых проявлений является хроническое паренхиматозное поражение печени. Характерным признаком является общее или локальное усиление пигментации кожи. У 30–60% пациентов с развившимся заболеванием имеется сахарный диабет. На ранних стадиях ГХ проявляется неспецифическими симптомами, такими, как летаргия, гепатомегалия, артропатия, кардиомиопатия, диабет, гиперпигментация кожи или гипогонадизм. Клинические проявления зависят от генетических и внешних факторов, таких, как содержание железа в диете, донорство крови и физиологические потери крови женщинами при менструациях.

В 1996 г. был идентифицирован ген, ответственный за наиболее частую форму ГХ, который получил название HFE. Этот ген кодирует трансмембранный белок, состоящий из короткого цитоплазматического домена, трансмембранного участка и 3 внеклеточных доменов, которые взаимодействуют с β_2 -микроглобулином на поверхности клетки. Белок HFE связывается на поверхности энтероцита с трансферриновым рецептором и снижает сродство к трансферрину, несущему железо. При отсутствии функционально активного HFE связывание и последующий эндцитоз трансферрина увеличиваются, что приводит к накоплению железа внутри клетки, где оно хранится в виде комплекса с ферритином. Среди пациентов кельтского происхождения с клинически выраженным ГХ, около 90% являются гомозиготами по мутации Цис₂₈₂–Тир в гене HFE, а у большинства оставшихся имеется сочетание Цис₂₈₂–Тир и другой мутации — Гис₆₃–Асп. В результате мутации Цис₂₈₂–Тир нарушается образование дисульфидной связи в одном из внеклеточных доменов белка HFE, нарушается его конформация и белок остается после синтеза в эндоплазматическом ретикулуме. В результате белок перестает экспрессироваться на поверхности клеток, что приводит к усиленному захвату железа, неадекватному потребностям организма. В большинстве европеоидных популяций частота гетерозиготных носителей аллеля Цис₂₈₂–Тир составляет около 10%, а у басков и ирландцев, имеющих кельтское происхождение, частота данного полиморфизма может достигать 30%. В отличие от европейцев у монголоидов и негроидов данная мутация почти не

встречается. Предполагается, что мутация Цис₂₈₂–Тир возникла около 2000 лет назад в кельтской популяции и распространилась по Европе за счет миграции населения, т.е. причиной высокой частоты данной мутации является эффект основателя.

Существуют и другие заболевания с клинической картиной, напоминающей классический семейный ГХ (также классифицируемый как ГХ 1-го типа), но имеющие другое происхождение. Ювенильный ГХ (2-й тип), так же как ГХ 1-го типа, наследуется по аутосомно-рецессивному типу и вызывается мутациями в неизвестном гене. ГХ 3-го типа также является рецессивным заболеванием и связан с мутацией в рецепторе трансферрина. ГХ 4-го и 5-го типа наследуются доминантно и вызываются мутациями в генах ферропортина, транспортирующего железо в кишечнике, и ферритина соответственно. Все эти формы очень редкие, и на сегодняшний день их определение не играет практической роли.

ПЕНЕТРАНТНОСТЬ

Мутация Цис₂₈₂–Тир в гене HFE характеризуется высокой пенетрантностью по отношению к промежуточному фенотипу, т.е. биохимическому признаку избытка железа в организме. У 95% мужчин старше 40 лет, являющихся гомозиготами по этой мутации, наблюдается избыток железа и имеются клинические признаки и симптомы. Женщины в пременопаузе имеют пониженный риск в связи с потерей крови при менструациях. Фенотипический эффект мутации Гис₆₃–Асп является менее выраженным. Фиброз или цирроз печени обнаруживается при анализе биопсии у 4–25% гомозиготных носителей аллеля Цис₂₈₂–Тир. Кроме того, аллель Цис₂₈₂–Тир предрасполагает к развитию гепатоклеточной карциномы. У мужчин с ГХ и циррозом относительный риск развития гепатоклеточной карциномы выше в 200 раз.

ТЕСТИРОВАНИЕ НА НОСИТЕЛЬСТВО

Наличие перечисленных выше симптомов является показанием для генетического тестирования на ГХ. Однако при этом диагноз ставится во время развернутой клинической картины, когда уже поздно проводить профилактику первичного дефекта. В связи с этим многие исследователи отстаивают необходи-

мость скрининга населения на наличие ГХ. Данное заболевание удовлетворяет многим требованиям, предъявляемым к заболеваниям, подвергающимся скринингу, т. е. встречается достаточно часто, имеет латентную фазу, предшествующую клиническим проявлениям, легко диагностируется биохимическими и генетическими методами и может быть предотвращено с помощью эффективного и недорогого лечения.

Вместе с тем пока массовый скрининг считается преждевременным в связи с неясностями, касающимися главным образом пенетрантности ГХ. Определенно целесообразным является тестирование родственников больных ГХ, у которых следует измерять уровень насыщения трансферрина железом, содержание ферритина и биохимические маркеры печеночной дисфункции, а также определять наличие мутаций в гене HFE по положению 282 и 63.

С технической точки зрения обнаружение этих мутаций не представляет сложности. Обычно используют рестрикционный анализ или различные формы аллельспецифической амплификации или гибридизации.

4.5.3.2. Наследственные тромбофилии

Тромбофилия — склонность к развитию тромбозов, связанная с врожденными и приобретенными нарушениями свертываемости крови и фибринолиза. Наиболее часто тромбофилии проявляются в виде венозных тромбозов и тромбозмболий, которые встречаются с частотой около 1 на 1000 населения в год.

Существуют семейные формы тромбофилий, описанные еще в 50-е годы. Первыми идентифицированными причинами наследственных тромбофилий (НТФ) были дефицит антитромбина III, протеина С и его кофактора протеина S. Позднее были идентифицированы еще две формы НТФ — мутация фактора V свертывания, которая вызывает резистентность фактора V к активированному протеину С, и мутация в гене протромбина G20210A, повышающая уровень протромбина в плазме. Кроме того, умеренная гипергомоцистеинемия, часто связанная с распространенным полиморфизмом в гене MTHFR, также является фактором риска венозного тромбоза.

ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ

Выраженность клинических проявлений НТФ сильно варьирует. Часто они протекают в очень мягкой форме и их наличие можно определить только лабораторными методами. Однако во многих случаях у носителей мутаций развиваются тромбоз глубоких вен нижних конечностей, легочный тромбоэмболизм, поверхностный тромбофлебит, а также венозные тромбозы другой локализации. Эти наследственные дефекты обычно не связаны с риском артериальной окклюзии. НТФ особенно предрасполагают к развитию тромбозов в молодом возрасте: до 40% пациентов моложе 45 лет с неспровоцированным тромбозом глубоких вен имеют одну из форм НТФ. У пациентов старшего возраста или при наличии провоцирующих факторов НТФ наблюдаются в 30% случаев тромбозов. У пациентов с сочетанием наследственных дефектов риск тромбоэмболических осложнений дополнительно повышается.

Наследственный дефицит антитромбина III и протеинов C и S встречается суммарно менее чем у 1% населения, однако у больных с венозным тромбоэмболизмом (ВТЭ) он обнаруживается почти в 10% случаев. Риск ВТЭ у таких больных в 5–8 раз выше, чем в общей популяции. Причинами дефицита этих естественных антикоагулянтов может быть снижение их синтеза или (гораздо чаще) снижение функциональной активности белка при сохранении нормального уровня. Дефекты синтеза или функционирования белка вызываются сотнями разнообразных мутаций в данных генах.

Наследственная резистентность к активированному протеину C является наиболее частой причиной НТФ. Более чем в 95% случаев резистентность вызывается миссенс-мутацией в гене фактора V, получившей название лейденской, при которой в положении 506 аргинин заменяется глутамином. По данному аминокислотному остатку в норме происходит протеолитическое расщепление фактора V активированным протеином C. Протеин C является естественным антикоагулянтом, который активируется тромбин-тромбомодулиновым комплексом на эндотелиальных клетках и разрушает факторы V_a и VIII_a, приводя к остановке тромбообразования. Этот процесс значительно ускоряется

в присутствии протеина S, действующего в качестве кофактора протеина C. При наличии в факторе Va аминокислотной замены Арг₅₀₆–Глн активированный протеин C не может его расщепить, что приводит к сохранению активности фактора Va и повышенному тромбообразованию (рис. 4.17).

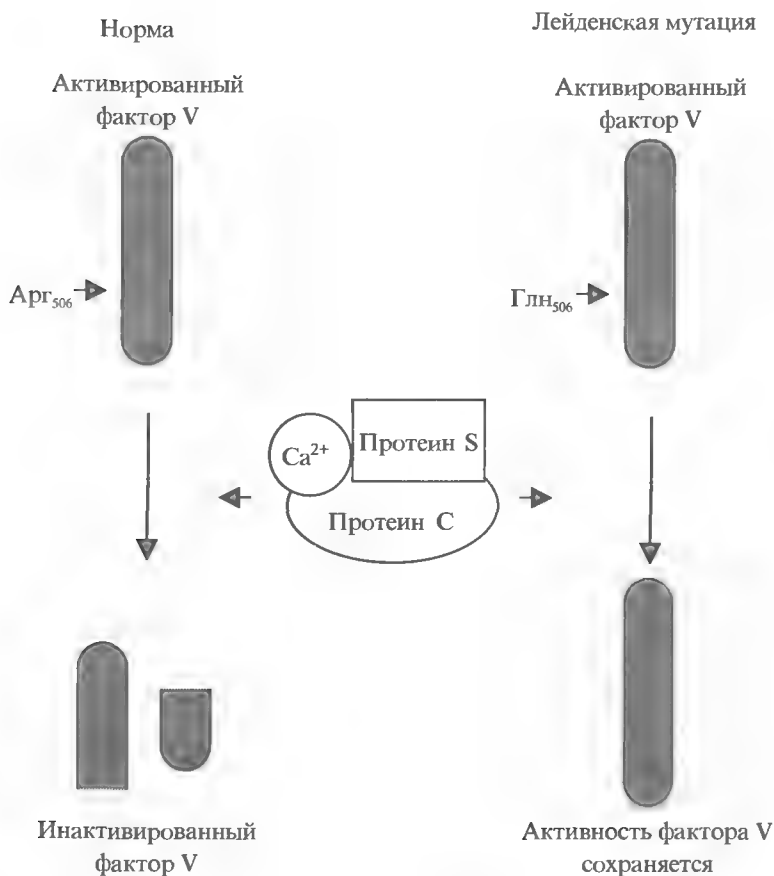


Рис. 4.17. Устойчивость к активированному протеину C, вызванная лейденской мутацией.

Лейденская мутация встречается почти исключительно у представителей европеоидной расы, в которой носителями являются около 5% населения. Вследствие высокой частоты данной генетической формы в общей популяции ее следует относить к полиморфизму, однако в литературе за ней закрепилось название мутации. Среди пациентов с ВТЭ частота данной мутации выше и составляет около 20%. Риск ВТЭ у носителей лейденской мутации зависит от дозы гена: у гетерозигот она повышена в 2–7 раз, а у гомозигот — в 40–80 раз. Суммарная вероятность развития тромбоза в течение жизни у носителей данной мутации составляет 30%.

Полиморфный аллель G20210A в 3'-нетранслируемой области гена протромбина в общей популяции встречается с частотой 2%, однако среди больных с ВТЭ доля носителей полиморфизма возрастает до 7%. Таким образом, наличие полиморфизма G20210A в гене протромбина повышает риск ВТЭ приблизительно в 3 раза. Патологическое действие данного полиморфизма заключается в повышении активности протромбина в плазме. Уровень протромбина у гомозигот AA в 1,5 раза выше, чем у гомозигот по нормальному аллелю GG, что способствует тромбообразованию. По-видимому, мутация G→A относится к типу мутаций с приобретением функции, поскольку она увеличивает эффективность процессинга 3'-конца мРНК, что приводит к накоплению мРНК и повышению синтеза белка протромбина.

Еще одним фактором предрасположенности к тромбозам является повышенный уровень гомоцистеина — аминокислоты, образующейся при метаболизме метионина. Умеренное повышение гомоцистеина повышает риск артериальных и венозных тромбозов. Причиной повышения может быть как неправильная диета (недостаток пиридоксина, кобаламина, фолата), так и генетические факторы, такие, как полиморфизм Aла₆₇₇–Вал в гене метилентетрагидрофолатредуктазы — фермента, играющего важную роль в определении уровня гомоцистеина в плазме. Активность данного варианта фермента составляет лишь около 1/3 от нормальной. Примерно 10% европеоидного населения являются гетерозиготными носителями данного полиморфизма. Частота ВТЭ у изолированных носителей этого полиморфизма не

отличается от нормальной, однако ряд данных показывает, что полиморфизм C677T способствует проявлению других НТФ.

БЕРЕМЕННОСТЬ И АКУШЕРСКАЯ ПАТОЛОГИЯ

При беременности повышается уровень витамин К-зависимых факторов свертывания, снижается содержание протеина S и ингибируется фибринолиз. Эти изменения физиологически целесообразны, поскольку направлены на снижение потери крови при родах, но при этом они приводят к повышению вероятности ВТЭ во время беременности (в 2,5 раза) и особенно в послеродовом периоде (в 20 раз). При наличии НТФ эта вероятность еще выше и может достигать 100-кратной у гомозигот по лейденской мутации фактора V. У большинства (до 60%) женщин с ВТЭ, развившимся во время беременности, обнаруживается лейденская мутация.

Помимо венозного тромбоэмболизма, НТФ вносят вклад в развитие акушерской патологии. Нарушение полноценной маточно-плацентарной циркуляции за счет тромбозов может приводить к разнообразным осложнениям беременности, таким, как невынашивание, мертворождение, отслойка плаценты, гестоз и внутриутробная задержка роста плода. В многочисленных исследованиях показана повышенная частота НТФ у пациенток с этими осложнениями. Есть также данные, что наличие мутации не только у матери, но и у плода может дополнительно увеличивать риск тромбозов и инфарктов плаценты, приводящих к потере плода. Относительный риск осложнений беременности у гетерозиготных носителей лейденской мутации или полиморфизма протромбинового гена G20210A по данным разных исследований увеличен в среднем в 2–3 раза.

Прием оральных контрацептивов также способствует развитию ВТЭ. Этот эффект многократно усиливается у женщин с НТФ. Риск развития ВТЭ у носительниц лейденской мутации, принимающих оральные контрацептивы, по разным оценкам, увеличивается в 20–65 раз. При наличии протромбина G20210A риск ВТЭ несколько ниже, но тоже существенно превышает нормальную величину. На основе этих наблюдений женщинам с дефицитом естественных антикоагулянтов, гомозиготам по лей-

денской мутации и при наличии сочетанных дефектов рекомендуется не использовать оральные контрацептивы.

Гормонозаместительная терапия после менопаузы является еще одним ятрогенным состоянием с 2–4-кратным повышением риска ВТЭ. При наличии лейденской мутации относительный риск может повышаться в 15 раз, а также возрастает частота повторных тромбозов. В связи с этим носительницам НТФ, у которых были эпизоды ВТЭ, рекомендуется не использовать гормонозаместительную терапию.

ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Анализ лейденской мутации и протромбинового полиморфизма G20210A, так же как определение дефицита антитромбина и протеинов C и S, является эффективным методом выявления лиц с повышенным риском тромботических состояний. Обнаружение данных мутаций позволяет проводить носителям профилактическую терапию антикоагулянтами.

В связи с невысокой абсолютной частотой ВТЭ массовый скрининг населения на наличие НТФ не оправдан. Считается более целесообразным обследовать на наличие НТФ следующие группы пациентов:

- лиц с ВТЭ независимо от возраста и тяжести проявлений;
- женщин с одним или более спонтанным абортом на поздней стадии либо с двумя или более выкидышами;
- беременные с внутриутробной задержкой роста плода или отслойкой плаценты;
- родственников первой степени родства пациента с НТФ в анамнезе;
- женщин с семейным анамнезом НТФ перед использованием оральных контрацептивов, гормонозаместительной терапии или беременностью.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ

Первоочередные тесты на наличие НТФ включают следующее:

- определение активности антитромбина (амидолитический метод);
- определение активности протеина C (коагулометрический или амидолитический метод);

- определение концентрации протеина S (общая и свободная фракции антигена);
- коагулометрическое определение устойчивости к активированному протеину C;
- определение лейденской мутации фактора V;
- определение полиморфизма протромбина G20210A;
- определение уровня гомоцистеина в плазме.

Как видно из приведенного списка, дефицит антитромбина и протеинов C и S определяют функциональными методами. Это связано с тем, что данные дефекты вызываются большим количеством мутаций и для их выявления требуются большие усилия и затраты, в то время как функциональные анализы просты и надежны.

Анализ лейденской мутации и полиморфизма протромбина несложен и хорошо дополняет функциональные тесты. По-видимому, анализ полиморфизма C677T в гене метилентетрагидрофолатредуктазы не имеет отдельного диагностического значения и должен использоваться в комбинации с биохимическим определением концентрации гомоцистеина в плазме. Применение данного набора тестов позволяет обнаружить наследственный дефект факторов свертывания или повышение гомоцистеина приблизительно у 40% пациентов с ВТЭ.

Наиболее надежным методом выявления лейденской мутации и протромбина G20210A является рестрикционный анализ, но также широко используются аллельспецифическая ПЦР и гибридизация.

4.5.3.3. Семейная гиперхолестеринемия

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) является, по-видимому, наиболее частым аутосомно-доминантным заболеванием человека. Частота СГХС в большинстве популяций 1 на 500. В популяциях с эффектом основателя гетерозиготные формы встречаются гораздо чаще: 1 на 70 у африканеров в Южной Африке и 1 на 200 у канадцев французского происхождения. По той же причине повышена частота СГХС у финнов, друзов и ливанцев.

Далеко не все случаи СГХС диагностируются клинически. Например, в России менее чем 1% пациентов с СГХС ставится клинический диагноз, а наиболее эффективная диагностика (свыше 40% идентифицированных носителей) проводится в Исландии благодаря небольшому размеру популяции с выраженным эффектом основателя и небольшой вариабельностью мутаций.

Основными диагностическими признаками СГХС являются повышенный уровень холестерина в крови, наличие сухожильных ксантом у больного или родственников первой степени родства и доминантный характер наследования повышенного уровня холестерина или ИБС.

Клинически СГХС проявляется повышением риска развития атеросклероза и его осложнений. Механизмы, связывающие повышение уровня холестерина с развитием ИБС, до конца не изучены. Предполагается, что высокий уровень богатых холестерином ЛПНП способствует их проникновению в стенку сосуда, где они окисляются и запускают цепь клеточных реакций, приводящих к накоплению липидов и локальной перестройке стенки сосуда, в результате чего образуется атеросклеротическая бляшка. При СГХС особенно повышается риск смерти от инфаркта миокарда в молодом возрасте — до 40 лет — в 100 раз. У не получающих лечения мужчин с СГХС к 60 годам вероятность ИБС составляет около 75%. По некоторым оценкам, лишь половина мужчин с СГХС доживает до 60 лет. Средний возраст начала ИБС равен 40–45 годам у мужчин, у женщин он на 10 лет больше. Таким образом, ИБС у больных с СГХС развивается на 10–20 лет раньше, чем в среднем по популяции.

Для снижения уровня липопротеинов плазмы при СГХС эффективно используются статины и другие липидснижающие препараты. Наиболее тяжелых больных (как правило, это гомозиготные случаи) лечат, удаляя избыток ЛПНП плазмаферезом. Иногда применяют пересадку печени.

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

При СГХС уровень холестерина повышен за счет увеличения содержания в плазме ЛПНП. Это метаболическое нарушение связано с уменьшением клиренса ЛПНП печенью в результате снижения экспрессии или активности клеточных рецепторов,

опосредующих захват частиц ЛПНП (ЛПНП-рецепторы). Активность ЛПНП-рецептора при СГХС снижается на всех клетках, экспрессирующих данный рецептор, однако функциональные последствия связаны главным образом с дефектом рецептора в печени, поскольку нарушение превращения холестерина в желчные кислоты приводит к снижению его выведения через кишечник. Аналогичные биохимические нарушения наблюдаются при мутационном изменении белка апоВ-100, который является лигандом для ЛПНП-рецептора. В результате такой мутации частицы ЛПНП перестают узнаваться ЛПНП-рецептором и накапливаются в плазме.

Ген ЛПНП-рецептора содержит 18 экзонов, которые кодируют 6 функциональных доменов этого белка: сигнальный пептид, лигандсвязывающий домен, домен, гомологичный предшественнику эпидермального фактора роста, участок О-гликозилирования, трансмембранный и цитоплазматический домены. Все известные мутации в гене LDLR собраны в базе данных UMD-LDLR, которая доступна через Интернет. Количество записей в ней превысило 800 и продолжает расти. По данным базы UMD-LDLR, однонуклеотидные замены составляют 90% всех мутаций в гене LDLR, из них большинство — миссенс- и нонсенс-мутации. Остальные 10% — в основном макроперестройки, вызванные неравной рекомбинацией с более чем 30 копиями Alu-последовательностей, присутствующими в данном гене. В промоторе обнаружено менее 10 мутаций.

Хотя СГХС является моногенным заболеванием, фенотипическая экспрессия, а именно тяжесть ИБС, сильно варьирует даже среди пациентов, несущих одинаковые мутации. Некоторые пациенты доживают до 80 лет и старше, в то время как другие умирают от инфаркта в 20 лет. Факторы, влияющие на клинические проявления, могут быть внешними, метаболическими и генетическими.

Из факторов внешней среды особую роль играют курение и диетические привычки. Курение является одним из сильнейших предикторов смертности от ИБС у больных с СГХС. Роль диеты в развитии СГХС была продемонстрирована путем сравнения пациентов китайского происхождения, проживающих в Канаде, с носителями тех же мутаций, но живущими в Китае.

У канадских китайцев уровень холестерина ЛПНП был на 70% выше, чем в Китае. Кроме того, 6 из 16 гетерозигот, живущих в Канаде, имели ксантомы, а у 4 была ИБС. Ни один из 18 обследованных, проживающих в Китае, не имел ксантом или ИБС. По-видимому, такие различия в клинических проявлениях связаны с разным потреблением ненасыщенных жиров. Этот пример ярко иллюстрирует модифицирующее влияние внешних факторов, таких, как диета, на фенотип гетерозиготной СГХС.

Течение заболевания сильно зависит от типа мутации, вызывающей гиперлипидемию. Наиболее тяжелая гиперхолестеринемия развивается при наличии нуль-мутаций, приводящих к полному отсутствию активного рецептора, в то время как мутации с сохранением частичного синтеза или активности ЛПНП-рецептора обычно вызывают более мягкое заболевание.

Известен ряд биохимических параметров, модифицирующих развитие ИБС у пациентов с СГХС. Такими метаболическими факторами являются: уровень ЛПВП-холестерина, С-реактивного белка и фибриногена. Некоторые из этих факторов, например уровень ЛПВП-холестерина и липопротеина Лп(а), имеют выраженную генетическую основу. Другие доказанные или предполагаемые генетические факторы включают мутации в гене липопротеинлипазы — изоформы аполипопротеина Е, варианты белка, переносящего эфиры холестерина, полиморфизм параоксоназы (фермента, расщепляющего липидные перекиси), особый генотип метилентетрагидрофолатредуктазы (связанный с повышенным уровнем гомоцистеина), полиморфизм в генах ренин-ангиотензиновой системы, а также микросомального триглицеридпереносящего белка, влияющего на секрецию ЛПОНП.

Таким образом, в генетическом плане мутации ЛПНП-рецептора являются главным фактором, определяющим развитие СГХС. Вклад других генов несомненен, однако вследствие относительной немногочисленности больных с идентифицированными мутациями ЛПНП-рецептора, требуются дальнейшие исследования генов-модификаторов. В идеале определение генотипа пациента по этим дополнительным генам позволит определять

степень риска ИБС и других осложнений у носителей той или иной мутации в гене ЛПНП-рецептора или апоВ-100.

ДНК-ДИАГНОСТИКА

Индивидуальный уровень ХС подвержен естественным изменениям, поэтому на основании одного измерения ХС нельзя делать вывод о наличии СГХС. Кроме того, уровень ХС зависит от возраста, пола и различается в разных популяциях. Уровень ХС при СГХС часто превышает средний уровень в общей популяции, поэтому ставить диагноз, основываясь только на результатах измерения ХС плазмы в ряде случаев, невозможно.

В настоящее время обнаружение мутаций в гене ЛПНП-рецептора или апоВ-100 является общепринятым критерием при диагностике СГХС. Мутация по 3500-му нуклеотиду в гене апоВ-100 (семейный дефект апоВ) является самой распространенной причиной СГХС в большинстве популяций. В Европе и странах, где проживают выходцы из Европы (Австралия, США, Канада и Новая Зеландия), у 3–5% пациентов СГХС вызывается именно этой мутацией. В странах со сложной генетической структурой заболевания удается найти мутации у 30–50% больных с клиническим диагнозом СГХС. Это связано как с недостаточной чувствительностью скрининговых методов, так и с неправильным диагнозом, установленным на основе уровня ХС и клинических проявлений. Не исключено также существование дополнительных генов, помимо LDLR и АРОВ, мутации в которых сопровождаются аналогичной клинической картиной.

В ряде популяций ДНК-диагностика СГХС существенно упрощается за счет наличия ограниченного количества мутантных аллелей.

Однако в большинстве генетически открытых популяций, к которым относится и Россия, ни одна мутация в гене ЛПНП-рецептора не встречается чаще, чем у 1% пациентов с СГХС, а обычно много реже. В связи с этим основную роль в ДНК-диагностике СГХС играют скрининговые методы поиска мутаций, такие, как определение полиморфизма конформации одноцепочечной ДНК с последующим подтверждением с помощью секвенирования.

4.5.3.4. Кистозный фиброз

Кистозный фиброз (КФ) является одним из наиболее распространенных и одновременно тяжелых аутосомно-рецессивных заболеваний человека. Среди европейцев частота носителей составляет около 1 на 50, а клинические формы встречаются в зависимости от региона с частотой 1 на 2–3 тыс. населения.

КФ получил свое название по характеру микроскопических изменений, наблюдаемых в поджелудочной железе у таких больных. При этом заболевании страдают также легкие, печень, тонкая кишка и мужская репродуктивная система. Ключевую роль в патогенезе играет избыточная секреция слизи эпителием этих органов, что приводит к закупорке бронхов или выводных протоков печени и поджелудочной железы. Несмотря на значительное усовершенствование симптоматических методов лечения, больные с КФ обычно не живут дольше 20–30 лет. Основной причиной смерти является поражение легких, вызванное закупоркой бронхов, создающей благоприятную среду для вторичных инфекций. Хронические инфекции и воспалительная реакция приводят к фиброзу легочной ткани, что в сочетании с обструкцией дыхательных путей может вызвать дыхательную недостаточность. У 65% пациентов закупорка протоков поджелудочной железы препятствует выделению пищеварительных ферментов в кишечник, что приводит к нарушениям пищеварения. Аналогично развивается нарушение секреции желчи печенью, наблюдающееся у 5% больных. Помимо этих проявлений, у 10% новорожденных развивается непроходимость тонкой кишки, требующая хирургического вмешательства. Кроме того, у 95% мужчин с КФ наблюдается бесплодие. Характерным признаком КФ, который широко используется для его диагностики, является повышенная соленость пота, связанная с нарушением реабсорбции ионов Cl^- эпителием, выстилающим протоки потовых желез.

КФ вызывается мутациями в белке, кодируемом геном CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Этот ген состоит из 27 экзонов и кодирует белок с молекулярной массой 168 кД, который содержит 2 трансмембранных домена, 2 внутриклеточных нуклеотидсвязывающих домена и регуляторный домен. Данный белок является каналом для ионов Cl^- . Этот канал

активируется под действием сАМР-зависимой протеинкиназы, которая фосфорилирует регуляторный домен. Выход Cl^- из клетки запускает цепь реакций, приводящих к закрытию Na^+ -каналов и усилению выработки слизистого секрета.

Наиболее частой причиной КФ является делеция 3 нуклеотидов в 508-м кодоне, приводящая к потере фенилаланина. Частота данной мутации у больных с КФ варьирует от 50% в Центральной Европе до почти 90% в Северной. В результате этой мутации нарушается нормальный процессинг белка и он после синтеза не транспортируется в плазматическую мембрану, а задерживается в эндоплазматическом ретикулуле и подвергается деградации. Однако существует большое число других мутаций, повреждающих данный белок; их число приближается к 1000. Эти более редкие мутации могут оказывать различное влияние на хлоридный канал, например частично или полностью снижать синтез белка, нарушать его внутриклеточный транспорт или снижать функциональную активность канала. Некоторые из этих мутаций вызывают лишь частичное снижение синтеза или активности канала, что может приводить к различным функциональным проявлениям. В тех случаях, когда сохраняется менее 3% активности, развивается тяжелый КФ, сопровождающийся поражением поджелудочной железы. При сохранении 3–8% активности поражаются легкие, а поджелудочная железа находится в норме. Если активность Cl^- канала составляет 8–12%, наблюдаются легкие формы, такие, как азооспермия у мужчин. Однако такое простое соотношение наблюдается далеко не всегда. Предсказать течение болезни можно только при наличии гомозиготности по делеции фенилаланина-508 или одновременного присутствия этой делеции и мутации G551D. При наличии этих мутаций заболевание протекает в классической тяжелой форме с поражением поджелудочной железы. В большинстве других случаев связь между типом мутации и проявлением заболевания предсказать сложно. Накапливается все больше данных, что КФ является олигогенным заболеванием и его фенотипические проявления зависят не только от характера мутации, но и от набора генов-модификаторов, присутствующих у пациента.

КФ почти всегда можно диагностировать на пренатальной стадии с помощью анализа ДНК из ворсин хориона, либо путем

прямого определения мутаций, либо с помощью анализа сцепления с использованием полиморфных внутригенных маркеров в тех случаях, когда мутации у больного ребенка неизвестны. В настоящее время рассматривается вопрос о скрининге населения на наличие КФ. Накопленная информация о генетической структуре КФ позволила выбрать 30 мутаций из почти 1000 известных, которые, однако, объясняют 90% случаев КФ в разных регионах Европы и США. Технически ДНК-диагностика КФ достаточно хорошо отработана, и для ее проведения выпускается ряд коммерческих наборов.

4.5.3.5. Гипертрофическая кардиомиопатия

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является одним из наиболее частых заболеваний человека с выраженной генетической предрасположенностью. Она встречается с частотой 1 на 500, что значительно превышает частоту другой семейной формы кардиомиопатии — дилатационной (1 на 2500). ГКМП наследуется по аутосомно-доминантному типу и характеризуется пенетрантностью до 75%. Клинически заболевание проявляется в виде гипертрофии левого и/или правого желудочка и увеличения размеров предсердия. Гипертрофия обычно является асимметричной и затрагивает межжелудочковую перегородку. Гистологически в мышце сердца наблюдаются гипертрофия и неупорядоченное расположение кардиомиоцитов, а также интерстициальный фиброз. Заболевание приводит к аритмиям и внезапной смерти, а также к сердечной недостаточности.

Причиной заболевания на молекулярном уровне является нарушение функции белков, входящих в состав саркомера, поэтому ГКМП иногда называют болезнью саркомера. Гипертрофия является компенсаторным ответом миокарда на снижение сократительной способности. В настоящее время идентифицировано 11 генов, мутации в которых приводят к ГКМП (табл. 4.11).

Мутации саркомерных белков по-разному влияют на сократительную функцию кардиомиоцитов. В результате миссенс-мутаций часто образуются стабильные, но неактивные белки, которые встраиваются в саркомер и нарушают его функцию, т. е. оказывают доминантно-негативное действие. В отличие от этого

Таблица 4.11. Мутации, приводящие к гипертрофической кардиомиопатии

Ген	Белок	Число описанных мутаций	Частота, %
MYH7	Тяжелая цепь β -миозина	70	35–50
MYH6	Тяжелая цепь α -миозина	1	?
MYL3	Желудочковая эссенциальная легкая цепь миозина	2	Менее 1
MYL2	Желудочковая регуляторная легкая цепь миозина	8	Менее 1
ACTC	Сердечный α -актин	5	?
TNNT2	Сердечный тропонин Т	14	15–20
TNNI3	Сердечный тропонин I	8	Менее 1
TNNC	Сердечный тропонин С	1	?
TPM1	α — Тропомиозин	5	Менее 5
MYBPC3	Сердечный миозинсвязывающий белок С	30	15–20
TTN	Титин	1	?
PRKAG2	AMP-активируемая протеинкиназа	2	?

мутации со сдвигом рамки приводят к образованию неактивных укороченных белков, подверженных ускоренной деградации. В обоих случаях сократительная активность падает и развивается компенсаторная гипертрофическая реакция.

Тип мутации может влиять на тяжесть заболевания. Например, высокий риск внезапной сердечной смерти связан с мутациями в гене MYH7 Арг₄₀₃–Глн, Арг₄₅₃–Цис и Арг₇₂₃–Гли. В отличие от этого мутации Гли₂₅₆–Глю, Вал₆₀₆–Мет и Лей₉₀₈–Вал не связаны с повышенным риском аритмий. Мутации в гене MYBPC3 обычно связаны с мягкой гипертрофией у молодых пациентов, поздним началом заболевания и относительно благоприятным прогнозом. Таким образом, знание типа мутации не только подтверждает диагноз ГКМП, но в ряде случаев помогает в определении прогноза.

В связи со значительной генетической гетерогенностью молекулярная диагностика ГКМП представляет определенную сложность. Из-за разнообразия мутаций для поиска при этом заболевании главным образом используются такие скрининговые методы, как анализ полиморфизма конформации одноцепочечной ДНК, электрофорез в градиенте денатуранта, а также денатурирующая ВЭЖХ. Поиск мутаций проводится главным образом в гене тяжелой цепи β -миозина, а также в генах сердечного тропонина Т и сердечного миозинсвязывающего белка С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев Г.В. Фибринолиз: биохимия, физиология, патология. — М.: МГУ, 1979. — 254 с.
- Бородин Е.А. Биохимический диагноз: Учебное пособие: В 2 ч. — Благовещенск, 1989. — 142 с.
- Данилова Л.А. Анализы крови и мочи. — СПб.: Салит-Медкнига, 2000. — 128 с.
- Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. — Казань, 2000. — 167 с.
- Клиническая биохимия / Под ред. В.А. Ткачука. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. — 358 с.
- Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. — Минск: Беларусь, 1982. — 234 с.
- Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. — М.; Элиста: АПП «Джангар», 2001. — 216 с.
- Кудряшов Б.А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975. — 201 с.
- Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
- Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: Пер. с англ. — М.: Мир, 1993. — Т. 1. — 384 с; Т. 2. — 415 с.
- Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия: Пер. с англ. — М.; СПб.: БИНОМ; Невский Диалект, 2000. — 368 с.
- Медведев В.В., Волчек Ю.З. Клиническая лабораторная диагностика: Справочник для врачей / Под ред. А.И. Карпищенко. — СПб.: Гиппократ, 1995. — 208 с.
- Наточин Ю.В., Немцов В.И., Эмануэль В.Л. Биохимия крови и диагностика. — СПб.: Клиническая больница РАН, 1993. — 149 с.
- Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Мясодев В.В., Завгородний И.В. Клиническая биохимия // Учебное пособие для студентов медицинских вузов. — М.: Триада-Х, 2002. — 504 с.
- Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. В.В. Меньшикова: Пер. с англ. — М.: Лабинформ, 1997. — 960 с.

СПРАВОЧНИК ТЕРМИНОВ

Адгезия — способность клеток избирательно прикрепляться друг к другу и к естественным или искусственным внеклеточным элементам.

Антиген (Аг) — 1) вещество, индуцирующее состояние чувствительности и/или резистентности к чужеродным соединениям при контакте с иммунной системой после латентного периода; 2) вещество, чужеродное или несущее признаки генетически чужеродной информации и вызывающее в организме развитие специфических иммунных реакций; точнее термин «антигенная детерминанта».

Аг главного комплекса гистосовместимости (HLA), лейкоцитарные Аг. Система обозначения продуктов генов сцепленных локусов (А, В, С и D) хромосомы 6; оказывают сильное влияние на аллотрансплантацию, при переливании крови не поддающимся лечению пациентам и при определенных сочетанных заболеваниях; идентифицировано более 60 аллелей; большинство располагается в локусах, ответственных за продукцию HLA-A и HLA-B. Экспрессия Аг главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex — МНС) служит диагностическим тестом при ряде эндокринных заболеваний (например, при сахарном диабете, диффузном токсическом зобе, наследуемой надпочечниковой недостаточности). HLA-молекулы, кодируемые генами МНС, подразделяют на два класса: молекулы МНС I класса (HLA-A, HLA-B и HLA-C), представленные на поверхности всех клеток, и молекулы МНС II класса (HLA-D, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR), представленные на поверхности иммунокомпетентных клеток. Неиммунокомпетентные эпителиальные клетки (например, фолликулярные клетки щитовидной железы при раннем проявлении аутоиммунного заболевания щитовидной железы или β -клетки островков Лангерганса при сахарном диабете) могут аномально экспрессировать белки МНС II класса.

Белок МНС II, экспрессируемый на поверхности эпителиальных клеток, запускает каскад патологических реакций.

Антитело (АТ) — 1) вещество, относящееся к классу Ig, специфически взаимодействующее со своим Аг; 2) один из классов Ig, появляющийся в сыворотке крови и жидкостях организма в результате антигенной стимуляции или естественно встречающийся.

АТ моноклональные — высокоспецифичные АТ, вырабатываемые клеточными гибридами одного клона. Техника гибридизации позволяет получить большое количество моноклональных АТ. Моноклональные АТ широко используют как инструмент в диагностике для определения концентрации белков и лекарств в сыворотке, для типирования тканей и крови, выявления инфекционных агентов, идентификации дифференцировочных Аг при диагностике и лечении лейкозов и лимфом, для выявления опухолевых Аг и аутоантител; моноклональные АТ к Т-клеткам применяют для профилактики отторжения и предотвращения реакции трансплантат против хозяина при пересадках костного мозга.

Аполипопротеин — белковая часть липопротеина.

Апопротеин — часть белка без простетической группы, необходимой для формирования активного голопротеина.

Апоптоз — запрограммированная гибель клеток, выполнивших свою функцию, и клеток с поврежденным геномом. При апоптозе цитоплазма клетки уплотняется, конденсируется хроматин, фрагментируется ДНК. На заключительных этапах апоптоза клетка распадается на части, фагоцитируемые макрофагами и гранулоцитами. Так, активация при апоптозе мембранного рецепторного гликопротеина Fas/Apo-1 приводит к гибели лимфоидных клеток, экспрессирующих этот рецептор. В клетках с поврежденной ДНК апоптозу предшествует экспрессия протоонкогенов *fos*, *myc* и *p53*. Апоптоз иногда подавлен (например, при аутоиммунном лимфопролиферативном синдроме угнетен апоптоз лимфоцитов вследствие мутации гена, кодирующего гликопротеин Fas/Apo-1).

Аутолиз — 1) разрушение клеток собственными ферментами; 2) повреждение клеток ферментами других клеток того же организма.

Белок G (протеин G) — внутриклеточные, связанные с клеточной мембраной белки, передающие сигнал на клеточные эффекторы.

G-белок классический — $G\alpha G\beta\gamma$ связывает ГТФ, после чего гетеротример распадается на $G\alpha$ и $G\beta\gamma$. Активируют или ингибируют ферменты и каналы как $G\alpha$, так и $G\beta\gamma$. G-белки участвуют в проведении сигнала от мембранных рецепторов ангиотензина II, ацетилхолина (мускариновые рецепторы), брадикинина, вазопрессина, гистамина, люлиберина, норадреналина, серотонина, тиреолиберина, тромбина, тромбоксана A_2 и др.

Ras G-белок. Связывающий нуклеозидтрифосфат (ГТФ) — активная форма Ras-белка, может переходить в неактивную форму (ГДФ) вследствие присутствия в Ras-белке активного центра ГТФазы; существуют дополнительные классы регуляторов Ras-белков [например, GTPase activating p. (GAP), активирующий ГТФазу белка]. Мишенью активного Ras-белка является продукт онкогена *raf* — Raf-белок-протеинкиназа, фосфорилирующая киназу MAP-киназы (MEK); в дальнейшем последовательные фосфорилирования субстратов киназного каскада приводят к транскрипции соответствующих генов.

Белки острой фазы — белки плазмы крови, связанные с воспалением, например С-реактивный белок, маннозасвязывающий протеин, α_1 -антитрипсин, фибриноген, церулоплазмин, компоненты комплемента C9 и фактор В.

Белки-переносчики аминокислот. Всасывание аминокислот в кишечнике, их реабсорбция в канальцах нефрона, а также поглощение аминокислот-нейромедиаторов нейронами и глиоцитами мозга реализуются при помощи переносчиков, кодируемых генами SLC1 и SLC3. Идентифицировано не менее 10 переносчиков, специфичных по отношению к β -, двухосновным, нейтральным и отдельным аминокислотам

Белки-переносчики глюкозы — интегральные гликопротеины. Инсулин увеличивает захват глюкозы клетками, вызывая быстрое перемещение этих гликопротеинов из цитоплазмы клетки в плазмолемму. Известны не менее 6 кодируемых генами GLUT трансмембранных переносчиков глюкозы из внеклеточной среды.

Билирубин — желчный пигмент в виде натриевой (растворимой в желчи) или кальциевой (нерастворимой, содержащейся в конкрементах желчного пузыря) соли; продукт восстановления биливердина, образуется в результате деградации гемовой части гемоглобина.

— **непрямой (неконъюгированный, несвязанный) б.** — фракция сывороточного билирубина, не соединяющаяся в клетках печени с глюкуроновой кислотой (назван так потому, что реагирует с диазореактивом Эрлиха только после добавления этилового спирта).

— **прямой (связанный, конъюгированный) б.** — фракция сывороточного билирубина, соединяющаяся в клетках печени с глюкуроновой кислотой с образованием диглюкуронида билирубина. Назван так потому, что напрямую реагирует с диазореактивом Эрлиха.

Биополимеры — высокомолекулярные соединения биологического происхождения, молекулы которых представляют собой цепочки, образованные из большого числа повторяющихся групп атомов; к биополимерам относят белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды.

Брадикинин — нанопептид, получаемый из декапептида (каллидина II, брадикининогена), который в свою очередь синтезируется из α_2 -глобулина под действием калликреина; присутствует в крови в неактивной форме; по действию аналогичен трипсину; один из кининов плазмы — потенциальный вазодилатор; один из физиологических медиаторов анафилаксии, высвобождается из тучных клеток при взаимодействии последних со специфическим Аг (аллергеном).

Вакутейнер — герметичная пробирка для забора крови с давлением ниже атмосферного внутри. Выпускают разные виды вакутейнеров: без добавок, с антикоагулянтами, с активатором свертывания, с гелем, обеспечивающим полное отделение сыворотки (плазмы) от форменных элементов крови.

Взаимодействие аллостерическое — изменение активности фермента путем изменения его конформации, осуществляемое в результате неконкурентного связывания какого-либо агента (не служащего субстратом) в участке (аллостерический участок), отличающемся от активного центра фермента.

Гаммапатия моноклональная — заболевание, характеризующееся повышенным синтезом одного из классов (клонов) иммуноглобулинов (чаще IgM) или одного из фрагментов иммуноглобулинов (легких и тяжелых цепей, Fc-фрагментов и т.д.); наблюдают чаще при злокачественной пролиферации какого-либо клона В-лимфоцитов.

Гематокрит (Ht) — отношение объема клеточных элементов к объему крови.

Ген — последовательность нуклеотидов в ДНК, которая кодирует структуру полипептида и тем самым обуславливает определенную функцию в организме или обеспечивает транскрипцию другого гена.

Генодиагностика (или ДНК-диагностика) — совокупность методов по выявлению мутаций, приводящих к наследственной патологии.

Гомеостаз — 1) состояние равновесия в организме в отношении различных функций и химического состава жидкостей и тканей; 2) процесс сохранения гомеостатического состояния.

Гомоцистинурия — расстройство, характеризующееся выделением гомоцистеина с мочой, задержкой умственного развития, эктопией хрусталика, редкими светлыми волосами, вывернутыми наружу коленями, тенденцией к судорожным реакциям, явлениями тромбоэмболии и жировым перерождением печени и сочетающееся с дефектом образования цистатионинсинтетазы; имеется множество форм гомоцистинурии.

Давление онкотическое — осмотическое давление, создаваемое коллоидами в растворе.

Давление осмотическое — стремление к выравниванию концентраций вещества с двух сторон полупроницаемой мембраны.

Дегенерация гепатолентикулярная (болезнь Уилсона) — наследственный дефект гена(ов), кодирующего транспортный белок меди; отсюда низкая активность цитохромоксидазы обмена меди. Характерны цирроз печени, дистрофические изменения в базальных ганглиях (в том числе в чечевицеобразном ядре), отложение пигмента зеленого цвета по периферии роговицы (кольцо Кайзера–Фляйшера), голубоватые полулуния на ногтях; клинически — стволые и мозжечковые расстройства, экстра-

пирамидная ригидность, гиперкинезы, расстройства психики, гиперкальцийурия, гиперфосфатурия.

Денситометрия — измерение оптической плотности; используют, например, при анализе рентгено- и хроматограмм.

Диазореакция (Эрлиха диазореакция) — цветная реакция между реактивом Эрлиха и рядом органических веществ, способных реагировать с ароматическими диазосоединениями; используют в общей и клинической биохимии и гистохимии.

Диазосоединения — легко вступающие в химические реакции органические соединения, в молекулу которых входит группировка из 2 атомов азота, связанная с одним углеводородным радикалом и с карбоксилем или гидроксилом; широко применяют в синтезе лекарственных средств, красителей, а также при гистохимических исследованиях.

Диapedез — выход форменных элементов крови через неповрежденные стенки капилляров и мелких вен.

Домен — участок молекулы биополимера, обладающий особой конформацией и ответственный за определенную функцию.

— **крингл-домен** — кренделевидный домен, характерный для молекул протеиназ фибринолитической системы, ответственный за связывание с остатками лизина фибрина и фибриногена.

Изоферменты (изозимы, изоэнзимы) — ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся по структуре и физико-химическим свойствам; определение в крови некоторых органоспецифических изоферментов, например изоферментов ЛДГ, используют в диагностике.

Иммуноглобулины (Ig) — класс структурно типовых белков, содержащих 2 вида парных полипептидных цепей: легкие (L) с низкой молекулярной массой цепи k или l и тяжелые (H) цепи; все 4 цепи связаны вместе дисульфидными связями; на основании структурных и антигенных признаков H-цепей Ig разделяют (в порядке относительного содержания в нормальной человеческой сыворотке) на IgG (7S по размеру, 80%), IgA (10S, 15%), IgM (19S, пентамер базисной единицы, 5S, 10%), IgD (менее 0,1%), IgE (менее 0,01%); все классы гомогенны и легко поддаются анализу аминокислотной последовательности; большое количество возможных комбинаций L- и H-цепей создает многообразие AT каждого индивидуума.

Иммунодиффузия — феномен, заключающийся в том, что при одновременной диффузии в геле растворимых Аг и АТ образуются полосы преципитации в зоне их оптимального соотношения; используют для обнаружения отдельных антигенов (или антител) в их смесях.

Ингибитор — агент, подавляющий или замедляющий ферментативные реакции.

Интегрины — семейство мембранных белков-рецепторов для белковых молекул внеклеточного матрикса — фибронектина, ламинина и др.

Интерлейкин (ИЛ) — один из цитокинов с известной аминокислотной последовательностью; сюда также относят монокины и лимфокины, действующие как факторы роста и дифференцировки лимфоцитов и других клеток. Цитокин (известно не менее 20), осуществляющий через соответствующие рецепторы взаимодействие между клетками, вовлекаемыми в защитный (в том числе иммунный) ответ; общий термин для всего класса — «цитокин», подклассы: лимфокины, монокины.

Интернализация — перемещение внутрь клетки, например опосредуемый рецепторами эндоцитоз молекул или частиц.

Интерференция — 1) в физике взаимное усиление или ослабление волн (электромагнитных, звуковых и др.) при их наложении друг на друга; на феномене интерференции основаны различные приборы и устройства, применяемые в рентгенологии, физиотерапии, лабораторной практике; 2) в генетике влияние кроссинговера, произошедшего в одном участке хромосомы, на вероятность возникновения кроссинговера в соседних участках этой же хромосомы (обычно уменьшение вероятности).

Исследование проспективное — исследование, в котором определенное количество пациентов подвергается наблюдению в течение длительного времени.

Кадгерины — белки с молекулярной массой 120 кД, состоят из 3 доменов: внеклеточного, мембранного и относительно небольшого цитоплазматического. Цитоплазматический домен соединен с элементами цитоскелета через белки катенины. При адгезии взаимодействуют N-концы внеклеточных доменов молекул кадгерина соседних клеток.

Кадгерин Е — белок межклеточных взаимодействий, экспрессируемый на поверхности эпителиальных клеток в составе промежуточных межклеточных контактов. Кадгерин Е уменьшает подвижность клеток опухолей эпителиальных тканей.

Кальмодулин — Ca^{2+} -связывающий белок; связывание с Ca^{2+} в цитоплазме клеток изменяет его конформацию и превращает его в активатор ферментов (например, фосфодиэстераз или киназы легкой цепи миозина в ГМК); регулятор процесса сокращения ГМК и многих внутриклеточных событий.

Клиренс (с указанием на удаление чего-либо) — удаление вещества из крови, выражаемое как объем протекающей артериальной крови или плазмы, который может содержать количество вещества, удаляемого за единицу времени (единицы измерения мл/мин).

Клон — совокупность потомков отдельного организма или клетки, образовавшихся в результате бесполого размножения и имеющих идентичные признаки.

Клонирование гена — получение необходимого числа идентичных копий определенного участка ДНК с использованием для этих целей микроорганизмов.

Компартментализация — структурная или функциональная специализация частей клетки.

Комплекс стехиометрический — специфическое связывание 2 компонентов или более в определенном соотношении (чаще всего 1 : 1, т.е. синоним эквимольного комплекса). Однако бывает и другое соотношение, например 1 молекула α_2 -макроглобулина может связывать и инактивировать 2 молекулы протеаз (стехиометрия 1 : 2).

Комплексоны — органические вещества, образующие прочные растворимые в воде комплексные соединения с катионами многих металлов; широко используют в фармацевтической промышленности и в практике лабораторных исследований.

Комплемент — комплекс сывороточных белков, активация которых происходит путем серии взаимодействий, приводящих к ферментативному расщеплению; происходит по одному из двух путей; в случае иммунного гемолиза (классический путь) комплекс охватывает 9 компонентов (обозначаемых с C1 по C9), взаимодействующих в определенной последовательности, их ак-

тивация инициируется комплексом Аг–АТ; альтернативный путь активируется иными, чем комплекс Аг–АТ, факторами и вовлекает другие компоненты (не С1, С2 и С4) для активации С3.

Константа Михаэлиса (K_m) — концентрация субстрата, при которой скорость катализируемой ферментом реакции равна половине максимальной (V_{max}).

Кофермент — термостабильное органическое соединение, необходимое организму как дополнительный фактор активности фермента, обычно входящее в состав фермента и образующее с его белковой частью легко диссоциирующий комплекс; большинство коферментов — производные витаминов.

Лag-фаза — задержка в развитии реакции. Может наблюдаться в ходе реакций, протекающих с образованием промежуточного продукта, или в системах с положительной обратной связью.

Лейкотриены — продукты метаболизма арахидоновой кислоты, образуются при липооксигеназном пути окисления арахидоновой кислоты; обладают физиологической активностью (например, медиаторы воспаления или вещества, участвующие в аллергических реакциях), вызывают значительное сокращение гладкой мускулатуры кишечника, сосудов, участвуют в регуляции иммунных реакций.

Лектины (агглютинины, фитогемагглютинины) — белки, вызывающие агглютинацию клеток различных типов; участвуют в преципитации и других феноменах, но не являются АТ; лектины известны с 1899 г., когда Стиллмарк (Stillmark) впервые выделил гемагглютинин из зерен клеверины; источником лектинов преимущественно являются растения, но они также найдены у представителей беспозвоночных и некоторых позвоночных; термин «фитогемагглютинин» применяют для обозначения лектинов растительного происхождения; лектины связываются с гликопротеинами, протеогликанами и гликолипидами клеточной мембраны, их используют как маркеры для исследования свойств поверхности нормальных и трансформированных клеток, для локализации и выделения молекул, содержащих углеводы.

Либерин — гормон, способствующий усилению синтеза и секреции соответствующего гормона в эндокринных клетках передней доли гипофиза.

Лиганд — 1) молекула, связанная с ионом металла координационными связями (например, порфириновая часть гема); 2) молекула, связанная с индикаторным элементом (например, радиоизотоп); 3) молекула (гормон, фактор роста, цитокин и др.), специфически связывающаяся с рецептором.

Лимфокины — собирательное название для белков и полипептидов, выделяемых активированными лимфоцитами, преимущественно Т-лимфоцитами.

Маркер — аллель (или признак), наследование которого прослеживается в потомстве.

— **генетический маркер** — полиморфный участок ДНК строго определенной локализации, разные аллели которого позволяют различать хромосомы и анализировать их сегрегацию в родословной.

Масс-спектрометрия — метод определения массы и относительного содержания компонентов в исследуемом веществе, основанный на разделении (с помощью электрических и магнитных полей) ионизированных атомов и молекул компонентов, характеризующихся разным отношением массы частицы к ее заряду; в медицине применяют, например, как экспресс-метод анализа газового состава выдыхаемого воздуха.

Медиаторы воспаления — биохимические факторы, вызывающие видимые симптомы (покраснение, отек) и жар; к ним относят гистамин, серотонин, факторы плазмы (система кинина и система комплемента), метаболиты арахидоновой кислоты. Это простагландины и лейкотриены, медиаторы, секретируемые лейкоцитами, медленно реагирующий фактор анафилаксии SRS-A, лимфокины, ИФН.

Метаболизм — совокупность процессов превращения веществ и энергии в живом организме и обмена организма веществами и энергией с окружающей средой.

Метаболит — любой продукт или субстрат метаболизма, чаще катаболизма.

Методы

— **иммунохимический** — количественный и качественный анализ веществ с использованием реакции антиген-антитело; в большинстве случаев исследуемое вещество является антигеном.

— **кинетический** — измерение превращения вещества во времени.

— **колориметрический** — совокупность методов количественного химического анализа, основанных на зависимости интенсивности окраски раствора от концентрации в нем окрашенного вещества; широко применяют при диагностических, гигиенических и экспериментальных исследованиях.

— **полимеразной цепной реакции** — катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий (амплификация) определенного участка ДНК. После 30–80 циклов накопления копий ДНК проводят их идентификацию методом электрофореза. Чрезвычайно чувствительный метод; теоретически для получения результата достаточно иметь в среде одну молекулу ДНК.

— **преципитации в геле** — модификация иммунохимического метода анализа антигенов, основан на различии скоростей их диффузии в геле агар-агара, содержащем соответствующие АТ, с образованием раздельных зон (полос, линий) преципитации.

— **референсный** — диагностическая процедура с минимальной вероятностью случайной или систематической ошибки измерения. Играет большую роль в оценке точности новых биохимических методов исследования.

Мицеллы — один из двух классов коллоидных частиц, состоящий либо из многих молекул, либо из одиночных макромолекул. Не являются индивидуальными частицами в свободной суспензии или растворе или структурными единицами кристаллов.

Модификация посттрансляционная — изменение первичной структуры белковой молекулы, происходящее после ее синтеза.

Нефелометрия — метод определения концентрации, размера и/или формы частиц веществ, находящихся в состоянии тонких взвесей, эмульсий или коллоидных растворов, путем измерения интенсивности их светорассеяния.

Нуклеозид — соединение сахара (обычно рибозы или дезоксирибозы) с пуриновым или пиримидиновым основанием с помощью N-гликозидной связи.

Нуклеотид — 1) соединение пуринового или пиримидинового основания, сахара (обычно рибозы или дезоксирибозы) и фосфатной группы; 2) в широком смысле любое соединение, содержащее

гетероцикл, связанный с фосфорилированной молекулой сахара с помощью N-гликозидной связи.

Оксид азота — бесцветный газ; реагирует с O_2 (при этом образуются NO_2 , N_2O_3 , N_2O_4), в итоге превращаясь в нитриты (NO_2^-) и нитраты (NO_3^-); естественный вазодилататор (эндотелием освобождаемый фактор вазодилатации), образующийся из L-аргинина в клетках эндотелия сосудов, макрофагах, нейтрофильных лейкоцитах, тромбоцитах. Газообразный медиатор межклеточных взаимодействий (костная ткань, мозг, эндотелий, β -клетки островков поджелудочной железы, периферические нервы), образующийся при помощи синтетазы окиси азота. В гепатоцитах, купферовских клетках, макрофагах, ГМК NO образуется при помощи индуцируемой эндотоксином синтетазы. NO имеет многочисленные иные функции (в частности, вызывает эрекцию, блокирует рост аксонов нервных клеток); недостаточность NO вызывает повышение АД, образование атеросклеротических бляшек, избыток NO токсичен и может привести к коллапсу.

Онкомаркеры (маркеры злокачественного роста) — вещества, выделяемые опухолью, по которым судят о присутствии в организме специфического типа опухоли.

Потенциометрия — метод регулирования электрического напряжения путем изменения электрического сопротивления.

Преципитация — феномен выпадения в осадок растворенного Ag при взаимодействии с AT, обусловленный нерастворимостью их комплекса в изотонических жидкостях.

Промотор — участок оперона, расположенный между оператором и структурными генами, ответственный за инициацию транскрипции генетической информации.

Простагландины — группа биологически активных соединений, относящихся к производным ненасыщенных жирных кислот, вырабатываемых клетками различных органов и тканей; участвуют в энергетическом обмене, повышая концентрацию в тканях циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) или Ca^{2+} . Простагландины синтезируются из арахидоновой кислоты под влиянием циклооксигеназы. Обладают значительной физиологической активностью: увеличивают проницаемость сосудистой стенки, влияют на сократимость сосудов и бронхов, изменяют

порог болевой чувствительности, участвуют в регуляции гомеостаза и иммунного статуса, секреты желудочного сока и т. д.

Процессинг — 1) процесс расщепления, перестройки и модификации молекул белка или нуклеиновой кислоты; 2) в широком смысле последовательность событий, связанных с Аг с момента его поступления в организм до выработки к нему АТ.

Рандомизация — процедура, обеспечивающая случайное распределение больных в экспериментальную и контрольную группы. В результате случайного распределения достигается отсутствие различий между двумя группами и, таким образом, снижается вероятность систематической ошибки в клинических исследованиях вследствие различий групп по каким-либо признакам.

Распределение Гаусса (нормальное распределение) — кривая колоколообразной формы, описывающая частотное распределение результатов повторных измерений, полученных одним и тем же методом. Характеризуется двумя параметрами — средним значением и стандартным отклонением. Используют для аппроксимации действительно существующего распределения значений показателя. Нормальное распределение не обязательно отражает естественное распределение.

Реагенты хаотропные — реагенты (обычно ионы), обладающие свойством нарушать химическую структуру воды и поэтому способствующие растворению неполярных веществ в полярных растворителях.

Реактив Эрлиха — водный раствор диазофенилсульфоновой кислоты, при взаимодействии которого с билирубином образуется карминово-красное окрашивание, а при взаимодействии с белками, содержащими тирозин, триптофан и/или гистидин, — оранжево-красное окрашивание; применяют при биохимических и гистохимических исследованиях.

Репрессор — белок, синтезируемый под контролем регуляторного гена, способный связываться с оператором, блокировать его функцию и тем самым подавлять синтез белка.

Рецептор — 1) анатомическое образование (чувствительное нервное окончание или специализированная клетка), преобразующее воспринимаемое раздражение в нервные импульсы; 2) молекулярная структура (как правило, белок), характеризующа-

яся избирательным сродством к лигандам (гормоны, нейромедиаторы, факторы роста, антигены и др.). Связывание лигандов с рецепторами приводит к изменению активности ферментов, участвующих в формировании вторичных посредников.

Рецептор антидиуретического гормона относят к связанным с G-белком трансмембранным гликопротеинам. Взаимодействие АДГ с его рецепторами V_1 -типа приводит к стимуляции фосфолипазы C, образованию фосфатидилинозитола и увеличению содержания внутриклеточного Ca^{2+} , а взаимодействие АДГ с рецепторами V_2 -типа приводит к стимуляции аденилатциклазы и образованию цАМФ.

Рецептор альдостерона — внутриклеточный полипептид с молекулярной массой 107 кД, связывает альдостерон (также кортизол, но не кортизон) и активирует транскрипцию генов с образованием специфических иРНК. Последующие реакции приводят к синтезу транспортных белков, обеспечивающих реабсорбцию натрия в дистальных почечных канальцах, а также экскрецию ионов калия, водорода, кальция и магния. Дефекты рецептора ведут к развитию псевдогипоальдостеронизма (задержка калия, потеря натрия, артериальная гипертензия при нормальной или даже повышенной секреции альдостерона).

Рецептор андрогенов относят к ядерным, содержит ДНК-связывающую область. Известно множество мутаций, приводящих к полной или частичной нечувствительности мишеней к андрогенам, например, при синдроме тестикулярной феминизации.

Рецептор глюкокортикоидов — фактор транскрипции, полипептид с молекулярной массой 94 кД из семейства онкогенов *erb-A*. По аутосомно-доминантному типу наследуется несколько мутаций, приводящих к развитию нечувствительности мишеней к глюкокортикоидам, клинически проявляющейся выраженной артериальной гипертензией и гипокалиемическим алкалозом у гомозигот, а лабораторно — повышением экскреции кортизола с мочой.

Рецептор ЛПНП — гликопротеин, экспрессируемый на поверхности большинства клеток организма, но преимущественно в гепатоцитах. Он участвует в захвате липопротеинов, содержащих в своем составе апоЛП-В и апоЛП-Е (т.е. главным образом ЛПНП и остатки ХМ). Мутации гена рецептора ЛПНП приводят

к семейной (наследуемой) гиперхолестеринемии, проявляющейся ксантомами, ксантелазмами и развитием ИБС (семейная гиперлипотеинемия типа II).

Рецептор ЛПОНП обильно представлен в миокарде, нервной, мышечной и жировой тканях (активно принимающих участие в метаболизме жирных кислот) и практически не экспрессируется в печени. Рецептор, наиболее вероятно, играет решающую роль в метаболизме триглицеридов.

Рецептор окситоцина — трансмембранный гликопротеин, связанный с G-белком и кодируемый геном OXTR. Экспрессия гена в ГМК миометрия существенно возрастает перед родами.

Рецептор Ca^{2+} парашитовидной железы (Ca^{2+} -сенсор) относится к вмонтированным в плазмолемму главных клеток гликопротеинам, связанным с G-белком. Мутации Ca^{2+} -сенсора — причина развития семейной формы гипокальцийурической гиперкальциемии, тяжелого гиперпаратиреоза новорожденных.

Рецептор прогестерона. Дефект рецептора приводит к отсутствию характерных для секреторной фазы менструального цикла изменений эндометрия. Полная резистентность прогестероновых рецепторов сопровождается женским бесплодием, частичная — возможным бесплодием и спонтанными выкидышами. При этом менструальный цикл нарушаться не будет. Содержание ЛГ и прогестерона в норме.

Рецептор пролактина — мембранный полипептид семейства цитокиновых рецепторов, кодируемый геном PRLR. Гены рецепторов гормона роста и пролактина происходят из общего предшественника и расположены рядом в хромосоме 5. Рецептор пролактина также связывает гормон роста, что объясняет лактогенный эффект при гиперсекреции соматотрофина (например, при акромегалии). Индуцируемый пролактином белок с неизвестной функцией экспрессируется в некоторых доброкачественных и злокачественных опухолях молочной железы, а также в потовых, слюнных и слезных железах.

Рецептор рианодинный. Идентифицированные при помощи алкалоида рианодина рецепторы (4 рецептора формируют мембранный кальциевый канал), регулирующие выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо Ca^{2+} ; рецепторы активируют рианодин и кофеин. Различают 3 типа (изоформы) рецепторов.

RYR1 — тип 1 рецепторов скелетно-мышечного типа, 5037 аминокислотных остатков, фосфорилируется зависимыми от цАМФ и кальмодулина способами; сопряжение возбуждения и сокращения: рецепторы саркоплазматического ретикулума активируют дигидропиридиновые рецепторы Т-трубочек, регистрирующие изменения мембранного потенциала.

RYR2 — тип 2 рецепторов кардиомиоцитов, 4967 аминокислотных остатков; активируются Ca^{2+} , поступающим в миоплазму из внеклеточного пространства при открытии потенциалозависимых каналов плазмолеммы кардиомиоцитов.

RYR3 — тип 3 рецепторов немышечного типа (например, β -клеток островков Лангерханса), 641 аминокислотный остаток, экспрессируются при взаимодействии клеток с трансформирующим фактором роста β , кофеин не взаимодействует с рецепторами.

Рецепторы тиреоидных гормонов относят к факторам транскрипции. Известно не менее 3 подтипов рецепторов тиреоидных гормонов: α_1 , α_2 , β . α_1 - и β -подтипы — трансформирующие гены ERBA1 и ERBA2, соответственно. Подтип α_1 (онкоген ERBA1) экспрессируется преимущественно в ЦНС, практически отсутствует в печени. Подтип α_2 экспрессируется в печени, почке, плаценте, мозге и других органах. Подтип β (онкоген ERBA2) экспрессируется во многих органах.

Рецептор тиреотропного гормона — трансмембранный гликопротеин, связанный с G-белком и кодируемый геном TSHR. Внеклеточный домен рецептора ТТГ имеет участки связывания с так называемыми стимулирующими щитовидную железу АТ (в том числе аутоантиген системной красной волчанки). Экспрессия гена происходит в фолликулярных клетках щитовидной железы, а также в ретробульбарных тканях, что объясняет механизм офтальмопатии при диффузном токсическом зобе. Мутации гена многочисленны, их последствия — синдромы резистентности щитовидной железы к эффектам ТТГ. Эндокринная функция щитовидной железы при этих синдромах может быть увеличена (гипертиреоз), уменьшена (гипотиреоз) или нормальна (эутиреоз).

Рецепторы фактора некроза опухолей. Различают рецепторы 2 основных типов (TNF-R55 и TNF-R75), TNF-R55 экс-

прессиируют разные типы клеток (включая злокачественные), TNF-R75 имеют преимущественно миелоидные и лимфоидные клетки (в особенности активированные Т- и В-лимфоциты). Рецептор TNF-R2, возможно, участвует в развитии инсулинорезистентности и метаболического синдрома. Гленн и соавт. (2000) тестировали маркеры в локусе TNF-R2 и близлежащих участках для изучения его влияния на развитие артериальной гипертензии, гиперхолестеринемии и повышенной концентрации в плазме растворимого рецептора TNF (sTNF-R2). Концентрация последнего при контрольно-опытном исследовании оказалась значительно выше у лиц с повышенным систолическим и диастолическим АД.

Рецептор эстрогенов относят к ядерным; это полипептид из 595 аминокислотных остатков, имеющий выраженную гомологию с протоонкогеном v-erbA.

Рианодин — алкалоид *Ryania speciosa* (семейство *Flacourtiaceae*), вызывающий выход Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума кардиомиоцитов (фибрилляция желудочков) и скелетных мышечных волокон (тетанус).

Рибонуклеиновая кислота (РНК) — макромолекула, состоящая из остатков рибонуклеозидов, соединенных фосфатом в направлении от 3'-гидроксила одного остатка к 5'-гидроксилу следующего, присутствует во всех клетках (в ядре и цитоплазме как в растворенном состоянии, так и в виде агрегатов), а также во многих вирусах.

Информационная РНК (иРНК). РНК, в точности отражающая нуклеотидную последовательность генетически активной ДНК и представляющая собой матрицу, по которой в цитоплазме синтезируется аминокислотная последовательность белка, первичная информация о которой закодирована в ДНК.

Рибосомная РНК (рРНК). РНК, входящая в состав рибосом и полирибосом.

Транспортная РНК (тРНК). Специальный вид низкомолекулярной РНК, способной связываться с одной аминокислотой и с определенными участками (кодонами) на иРНК.

Синдромы

— **Барттера** — характеризуется почечной потерей калия, гипокалиемией, метаболическим алкалозом и полиурией. АД

обычно нормальное или сниженное, но уровень ренина и альдостерона чрезвычайно высок. Вследствие дефекта реабсорбции хлора в восходящей толстой части петли Генле избыточно секретируется K^+ , откуда — гипокалиемия.

— **Гланцманна** — геморрагический диатез, проявляющийся нормальным или удлинённым временем кровотечения; при нормальном времени свертывания ретракция сгустка дефектна; при нормальном количестве тромбоцитов имеются их морфологические или функциональные аномалии.

— **ДВС** — геморрагический синдром, возникающий в результате нарушения процесса регуляции активации факторов свертывания и фибринолитических ферментов (грамотрицательный сепсис); отложение фибрина приводит к закупорке капилляров, тромбоциты и факторы свертывания расходуются (коагулопатия потребления), продукты деградации фибрина ингибируют его полимеризацию, приводя в конечном счете к некрозу тканей и кровотечениям.

— **демпинг-синдром** наблюдается после еды у больных с анастомозом верхних отделов пищеварительного тракта и проявляется покраснением, гипергидрозом, головокружением, слабостью и сосудистым коллапсом.

— **Жильбера** — умеренная неконъюгированная гипербилирубинемия (как правило, у мальчиков) с доброкачественным течением при нормальных анализах крови (хотя возможна гемолитическая желтуха) и печеночных пробах, требующая дифференциальной диагностики с хроническим гепатитом и другими наследуемыми гипербилирубинемиями.

— **карциноидный** — сочетание симптомов и нарушений, обычно вызываемых высвобождением серотонина из карциноидных опухолей ЖКТ, метастазирующих в печень: преходящее пятнистое покраснение, гемангиомы кожи, приобретенный трикуспидальный и легочный стеноз с вовлечением клапанов левой половины сердца, диареей, бронхоспазмом, экскрецией 5-гидроксииндолуксусной кислоты.

— **Конна** — расстройство, вызывающее чрезмерную секрецию альдостерона и характеризующееся головными болями, полиурией, слабостью, артериальной гипертензией, гипокалиемическим алкалозом, недостатком калия, гиперволемией и пони-

женной активностью ренина; может развиваться в связи с доброкачественными новообразованиями коры надпочечников или ее гиперплазией.

— **Криглера–Найяра** — редкое наследственное нарушение, связанное с недостаточностью глюкуронилтрансферазы. Пациенты с I (полным) типом болезни имеют тяжелую гипербилирубинемию; смерть обычно наступает на 1-м году жизни на фоне ядерной желтухи. Пациенты со II (неполным) типом болезни имеют менее тяжелую гипербилирубинемию (< 20 мг%), купируемую фенобарбиталом. Как правило, синдром отмечают у новорожденных. Клинически характерны выраженная желтуха, ахоличный стул, ядерная желтуха, недоразвитие зубной эмали.

— **миелопролиферативный** — общее название группы болезней, характеризующихся гиперплазией миелоидной ткани (хронический миелолейкоз, миелофиброз, первичная тромбоцитемия, эритремия и др.)

— **нефротический** — клиническое состояние в виде отека, альбуминурии, снижения уровня альбумина плазмы; тельца с двойной рефракцией в моче и обычно увеличение в крови содержания холестерина; в клетках почечных канальцев могут присутствовать липидные включения, но главные нарушения состоят в повышении проницаемости базальных мембран клубочковых капилляров.

— **почечной остеодистрофии** — диффузное поражение скелета при почечной недостаточности, обусловленное нарушением кальциевого и фосфорного обмена.

— **респираторный дистресс** — синдром тяжелой дыхательной недостаточности у новорожденных в первые часы жизни, наблюдающийся при аномалиях развития диафрагмы, легких, сердца, внутриутробных инфекциях, родовой травме, болезни гиалиновых мембран и т. д.

— **Снеддона** — цереброваскулярные нарушения при антифосфолипидном синдроме.

— **Фанкони** — группа нарушений, характеризующихся расстройствами функций канальцев почки, наследуемым дефектом обмена цистина, генерализованным отложением кристаллов цистина в сочетании с полиурией, глюкозурией, выраженной потерей аминокислот с мочой, хроническим ацидозом (часто

с гипокалиемией), гипофосфатемией, резистентным к терапии витамином D рахитом.

Система буферная — совокупность находящихся в растворе веществ, благодаря которым при разбавлении или концентрировании раствора, а также при добавлении к нему небольших количеств кислот или щелочей pH раствора сохраняется постоянным; буферные системы крови играют важную роль в поддержании гомеостаза организма.

Скрининг — обследование больших групп людей на выявление каких-либо состояний (болезней или носительства) с целью активной профилактики тяжелых форм болезней; предположительное выявление недиагностированной ранее болезни с помощью простых методов, дающих быстрый ответ.

Солюбилизация — перевод компонента в растворенное состояние (например, с помощью детергентов, хаотропных соединений и др.).

Спектроскопия — регистрация спектров излучения и поглощения; в медицине применяют для быстрого качественного и полуколичественного анализа веществ.

Спектрофотометрия — метод качественного и количественного анализа веществ, основанный на измерении их спектров поглощения или излучения; применяют в лабораторной практике.

Специфичность диагностического теста — вероятность отрицательного результата диагностического теста при отсутствии заболевания.

Супернатант — надосадочная жидкость (например, после центрифугирования образца).

Точка изоэлектрическая — величина pH среды, при которой концентрация положительных и отрицательных ионов одинакова; один из основных параметров, определяющих электрохимические свойства амфолитов, например аминокислот и белков; определение изоэлектрической точки различных субстратов организма может производиться в диагностических целях методом изоэлектрофокусировки.

Трансген — ген, вводимый в клетку при генной терапии; включают в состав плазмиды-вектора.

Транскортин — связывающий глюкокортикоиды α -глобулин, иРНК которого обнаружена в большом количестве в печени,

а также в легких, яичках и почках. Дефицит инсулина и эстрогены повышают содержание транскортина. Заболевания печени и почек, а также длительный прием глюкокортикоидов сопровождаются снижением содержания транскортина.

Тромбоксаны — группа соединений, биохимически связанных с простагландинами; образуются при циклооксигеназном окислении арахидоновой кислоты, влияют на агрегацию тромбоцитов, вызывают сокращение сосудов.

Тромбоспондин — многофункциональный белок, имеет участки связывания с тромбином, фибриногеном, гепарином, плазминогеном, активатором плазминогена, фибронектином, коллагеном, ламинином и другими молекулами; вырабатывается многими клетками; впервые обнаружен в α -гранулах тромбоцитов; участвует в агрегации тромбоцитов и клеточной адгезии и как таковой регулирует миграцию клеток (например, миграцию предшественников клеток-зерен в коре мозжечка).

Турбидиметрия — метод фотометрического анализа, при котором измеряют не специфическое поглощение, а снижение интенсивности светового луча, обусловленное его рассеиванием взвесями, эмульсиями или коллоидными растворами.

Фактор некроза опухолей (TNF, гены TNF- α и TNF- β) — многофункциональный цитокин, реализующий эффекты посредством рецепторов 2 основных типов (TNF-R55, TNF-R75); поскольку TNF имеет выраженные цитостатический и цитотоксический эффекты по отношению к злокачественным клеткам, а также стимулирует иммунную систему, было предложено использовать TNF как противоопухолевое средство, однако токсические эффекты TNF сдерживают его применение.

TNF- α вырабатывают активированные моноциты и макрофаги, а также клетки злокачественных опухолей; его мембранно-связанный предшественник состоит из 233 аминокислотных остатков, активная форма — из 157 (процессинг предшественника катализируют металлопротеиназы межклеточного матрикса); мощный иммуномодулятор и воспалительный агент, провоцирующий развитие ревматоидного артрита, болезни Крона, множественного склероза, эндотоксического шока, кахексии при раке и инфекции вирусом иммунодефицита человека. TNF- α

совместно с γ -ИФН стимулирует выработку NO, а также простагландина E_2 в эпителии.

TNF- β — цитолитический фактор, вырабатываемый CD4- и CD8-лимфоцитами при антигенной стимуляции.

Флюорометрия — метод измерения интенсивности люминесценции; в медицине флюорометрию применяют для обнаружения и количественного определения люминесцирующего вещества в различных средах и материалах.

Флюоресценция — эмиссия длинноволнового излучения веществом в результате абсорбции энергии коротковолнового облучения, продолжающаяся в течение стимулирующего воздействия; отличается от фосфоресценции, при которой подобная эмиссия продолжается в течение некоторого времени и после удаления стимула.

Фотометрия — совокупность методов измерения энергетических параметров оптического излучения, характеризующих процессы его испускания, распространения, поглощения и рассеяния.

— **абсорбционная** — основанная на измерении светопоглощения анализируемым объектом; применяют в лабораторной практике, например, для количественного анализа биологически активных веществ.

— **пламенная** (эмиссионная) — основанная на измерении спектральных характеристик исследуемых веществ; применяют, например, для определения ионного состава биологических жидкостей.

Хелаторы — вещества с одной или большим количеством полярных групп в одной молекуле, участвующие в образовании комплекса с ионами металлов (например, двухвалентное железо в геме хелируется порфириновым кольцом). Хелаторы используют для удаления нежелательных ионов в биологических реакциях (например, связывание ионов Ca^{2+} с ЭДТА, выступающей в роли антикоагулянта).

Хроматография — метод разделения и анализа смесей веществ, основанный на различном распределении их компонентов между подвижной (газ или жидкость) и неподвижной (твердый сорбент) фазами; применяют, например, в биохимических исследованиях, при производстве лекарственных средств.

Хромогены — органические вещества, содержащие в молекуле хромофорные группы; к хромогенам относят, например, пигменты.

Цитокины — белки (например, лимфокины), вырабатываемые клетками при контакте с определенными Аг и митогенами; выступают как межклеточные медиаторы при иммунном ответе; регулируют пролиферативную активность и экспрессию фенотипа клеток-мишеней. Образуют семейство, в которое входят факторы роста, ИЛ, факторы некроза опухоли, колиниестимулирующие факторы, интерфероны, факторы супрессии и др.

Цитостатики — лекарственные средства, подавляющие деление клеток; используют главным образом для лечения злокачественных опухолей.

Чувствительность диагностического теста — вероятность положительного результата диагностического теста при наличии заболевания.

Экзоцитоз — выделение веществ из клетки; подлежащий экзоцитозу материал находится в секреторных пузырьках (гранулах), их мембрана сливается с клеточной мембраной.

Эндотоксин — 1) бактериальный токсин, прижизненно не выделяющийся в окружающую среду; 2) фосфолипидно-полисахаридный макромолекулярный комплекс, составная часть клеточной стенки разнообразных сравнительно авирулентных и вирулентных штаммов грамотрицательных бактерий; токсины выделяются только при нарушении целостности бактериальной стенки; в большинстве термостабильны, эффект слабее большинства экзотоксинов, менее специфичны, что определяет невозможность получения анатоксинов.

Эндоцитоз — поступление в клетку веществ, частиц, бактерий и т. д.

— **опосредуемый рецепторами** — разновидность эндоцитоза; ЛПНП (переносчики холестерина в клетку), трансферрин и другие крупные молекулы связываются со своими рецепторами, встроенными в клеточную мембрану, накапливаются в окаймленных ямках, поступают в клетку и транспортируются в ней в составе окаймленных пузырьков, окруженных плотной оболочкой.

Экстинкция — в биохимическом контексте означает поглотельную способность при проведении спектрофотометрии.

Электрофорез — перемещение электрически заряженных частиц дисперсной фазы в дисперсионной среде под действием внешнего электрического поля к катоду или аноду; явление электрофореза используют, например, в физиотерапии, в некоторых методах лабораторных биохимических исследований.

Эндотелин-1 — мощный сосудосуживающий фактор, секретируемый эндотелиальными клетками вен, коронарных артерий и артерий мозга. Эндотелин-1 участвует также в аутокринной регуляции эндотелиальных клеток, индуцируя выработку оксида азота и простациклина; стимулирует секрецию атриопептида и альдостерона, подавляет секрецию ренина, вызывает бронхоконстрикцию. Рецепторы эндотелина — белки семейства рецепторных тирозинкиназ, различают подтипы А (опосредуют вазоконстрикцию при связывании с эндотелином-1) и В (некоторые агонисты могут вызвать вазодилатацию).

Эффектор — 1) в физиологии орган, деятельность (функциональное состояние) которого изменяется в результате управляющего воздействия ЦНС, ее определенного отдела или определенного рефлекса; 2) в генетике молекула, изменяющая активность репрессора и тем самым регулирующая трансляцию; 3) в биохимии вещество, изменяющее скорость ферментативной реакции, взаимодействуя с ферментом.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аденилатциклаза 297, 301, 303,
304, 339, 341, 429, 492

Аденилосукцинатлиаза 61, 62

Аденинфосфорибозилтрансфера-
за 60, 62

Аденозиндезаминаза 61, 63

АКТГ-стимулирующий тест 317

Активированное частичное
тромбопластиновое время
(АЧТВ) 240, 249

Аланинаминотрансфераза
(АЛТ) 104

Алкалоз 20, 21, 25, 29–32,
34–40, 95

Альбумины 25, 45

α -Фетопроtein 390

Амилокластические методы 110

Аминотрансферазы 104, 106

Аммиак 28, 35, 370

Андробластома и арренобласто-
ма 321

Анемии 33, 68, 69, 72, 119, 125,
336

Анионный интервал плазмы 25

Антифосфолипидный синдром
206, 207

Арахидоновая кислота 82, 234,
235, 303, 304, 487, 488, 490,
499

Артериальная гипертензия 75,
87, 230, 285, 313, 331, 337,
492, 495

Аспаратаминотрансфераза
(АСТ) 103

Атеросклеротическая бляшка
225–227, 229, 469

Атомно-абсорбционная спектро-
фотометрия 98

Ацидоз 20, 21, 25, 26, 29–33,
35–37, 40, 92, 94, 127, 343,
369, 376

Бикарбонат истинный 22, 23
— стандартный 22, 23

Билирубин 47–52, 166, 367, 482

Болезнь Кушинга 88, 93, 313,
315–317, 320, 330, 331, 335,
336, 342

Буферные системы крови 24

Волчаночный антикоагулянт
206, 207

Время кровотечения 240

γ -Глутамилтранспептидаза (ГГТ)
113

Гемофилия 206, 251

Гепарин 55, 94, 107, 122,
186–191, 193, 195, 196,
202–204, 239, 250, 251,
253–255, 264, 336

Гипербилирубинемия 48, 49,
367, 368, 496

- Гипервентиляция 21, 27, 39, 40
 Гиперкалиемия 35, 91, 92, 94, 95
 Гиперлипидемия 88, 97, 150, 155
 Гипернатриемия 88
 Гиперпротеинемия 26, 43, 97
 Гипертриглицеридемия 151, 155–157, 365
 Гиперурикемия 58–61
 Гиперфосфатемия 100, 374
 Гиперхолестеринемия 148, 150–152, 162, 163, 365, 428, 454, 455, 459, 468, 471
 Гиповентиляция 21, 37
 Гипокалиемия 25, 39, 81, 83, 90, 92–94, 314, 337, 343, 495, 496, 498
 Гипоксантинфосфорибозил-трансфераза 60, 61
 Гипомагниземия 80, 81, 83
 Гипонатриемия 88, 89, 94
 Гипопротеинемия 43, 88
 Гипоурикемия 58, 60, 63
 Гипофосфатемия 99, 100, 371–373, 376, 498
 Гликогенфосфорилаза 352, 358
 Гликозилированный гемоглобин 348
 Глобулины 45, 46, 139, 365
 Глюкоза мочи и крови 64, 157, 273, 345, 349
 Глюкозотолерантный тест 346
 Глюкокластические методы 110, 111
 Гонадолибериновый тест 324
 Гуморальный путь регуляции 281, 301
 Дексаметазонсупрессорный тест 317
 Делеции 425, 426, 429, 456, 458, 474
 Детекция мутаций в диагностике 430, 451
 Диагностика неотложная 10, 12, 19
 Диагностическая значимость 240, 253
 Дисфибриногенемия 177, 252–254
 Доминантно-негативный эффект (действие) 428, 475
 Дыхание Куссмауля 30, 31, 36, 37
 Инсерции 425, 426
 Инсулинотолерантный гипогликемический тест 317
 Интервал нормы 11, 360
 Инфаркт миокарда 81, 82, 105, 116–118, 120, 122, 123, 125–127, 157, 162, 206, 208, 221, 222, 225, 226, 231, 237, 337, 350–361, 469
 Информативность 323, 454
 Ионоселективные электроды (ИСЭ) 77, 96
 Кальцитонин 79, 273, 325, 371, 373
 Кардиолипид 206, 207
 Кетоацидоз 31, 32, 36, 88, 89, 342, 348, 349
 Кетоновые тела в моче и плазме 32, 345
 Кислотно-щелочное равновесие 19, 24
 Кломифеновый тест 324
 Коагулометры 246, 250

Контроль качества 11–13, 112, 387

Креатинин 53–57, 81, 113, 348, 349, 360, 369, 375

Креатинкиназа 117, 118

Крингл-домены 168, 211

Ксантиноксидаза 60–62, 102

Лабораторная диагностика 9–11, 13, 14, 314, 348, 352

Лактат-ацидоз 33, 34

Лактатдегидрогеназа 123

Лейденская мутация 465, 466, 468

Либерины 274, 276, 278

Маркеры апоптоза 391

Международное нормализованное отношение (МНО) 244

Метод Квика 241, 243

— Клаусса 255, 256

— Лоури 44

Миоаденилатдезаминаза 61, 62

Миоглобин 47, 66, 67, 352, 353, 356, 358–360

Миссенс-мутации 425, 475

Мочевая кислота 57–64, 102, 369

Мраморная болезнь 377

Мутации с потерей функции 427, 428

— — приобретением функции 428, 429

Нагрузочный тест 86

Нейро-секреторные клетки 301

Нейронспецифическая енолаза (НСЕ) 418

Неотложная диагностика 19, 95

Нервный механизм регуляции 281, 294

Нестабильные мутации 426

Обмен пуринов 57, 60

Общий белок плазмы 42

Опухолевые маркеры ангиогенеза 396

Остеодистрофии 374, 376, 429

Остеомалация 132, 133, 372, 374, 375

Отравления 35, 366

Пламенная атомная эмиссионная спектроскопия (ПАЭС) 96

Подagra 58–62, 75

Поликистоз яичников 320

Препроинсулин 288, 306

Проинсулин 288, 289, 306

Протеиназы 45, 46, 289, 298, 484

Протромбиновый тест (ПТ) 240, 241

Пуриннуклеозидфосфорилаза 61, 63, 102

Радиоиммунный анализ 371

Рак шейки матки 415, 416, 420

— эндометрия 417

Раково-эмбриональный антиген (РЭА) 388

Реакция Киллиани–Зака 164

Рецепторы факторов роста 394, 411

Сахарный диабет 80, 148, 156, 163, 230, 241, 310, 325, 341, 345, 346, 348, 376, 460

Сидром Барттера 38, 39, 495

Синдром внутриклеточного холестаза 366, 368

- внутрипеченочного и внепеченочного холестаза 366
- воспалительный 45
- замедления инактивации токсических соединений 369
- недостаточности синтетических процессов 366, 369
- токсического поражения гепатоцитов 366, 368
- цитолиза 366, 368

Синдромы колоректального рака 383

Системная красная волчанка 494

Стандарт 13

Статины 276, 469

Стрептокиназа 223, 263, 267

Сывороточный антиген плоскоклеточной карциномы (SCC) 420

Тест стимуляции хорионическим гонадотропином 324

Тиреолибериновый тест 329

Тканевые маркеры рака молочной железы 408

Трансферрин 45, 66, 67, 69, 70, 73, 501

Тромбиновое/рептилазное время (ТВ/РВ) 240

Тромбоз 208, 222, 224–227, 231, 234–237, 247, 284, 462, 463

Тропины 274, 278, 281

Уриказа 57, 64

Уровень глюкозы 92, 338, 340, 342, 345–348

Урокиназа 187, 209, 210, 217, 219, 264, 268, 269

Факторы, влияющие на определение опухолевых маркеров 379

- диагностического значения 456

- эффективности 454

Ферритин 66, 67, 69, 72, 73

Фибриноген 169, 173–178, 214, 229, 232, 234, 240, 241, 255, 257, 262, 265, 270, 365, 481

Фрагмент цитокератина 19 (CYFRA 21-1) 420

Фруктозамин 348

Функциональные пробы 12, 95

Хромогенные методы 110, 111

Циклическая активность эпифиза 279

Циклический АМФ 57, 62, 121, 122, 278

Циклопентанопергидрофенантрен 290

Щелочная фосфатаза 130, 375, 376

Электрофореграмма сыворотки 46

Эстафетная передача регуляторного сигнала 286

Эуглобулины 240

Эффект дозы гена 428



Н О В И Н К А
ИЗДАТЕЛЬСКОГО ДОМА «ГЭОТАР-МЕД»

**ЛАБОРАТОРНЫЕ
И ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ
В ДИАГНОСТИКЕ:
Справочник**

Под ред. В.Н. Титова
2004. — 960 с.
Обложка



Настоящее издание — самый полный справочник диагностических тестов, позволяющий быстро находить нужную информацию. Справочник состоит из двух частей. В первой части приведены ключевые диагностические критерии более 500 самых распространенных заболеваний. Вторая часть содержит описания более 550 лабораторных и инструментальных диагностических тестов, объединенных в разделы (например, исследования крови, ультразвуковые исследования и т.д.).

Описания диагностических тестов включают краткую характеристику теста, цели проведения, подготовку пациента, технику выполнения и последующий уход за пациентом, меры предосторожности, нормальную картину, отклонение от нормы и факторы, влияющие на результаты исследования. Приложения содержат нормальные значения лабораторных показателей, уровни лекарственных средств в крови и информацию для пациентов по проведению различных процедур в домашних условиях.

Издание предназначено врачам всех специальностей, специалистам лабораторной и инструментальной диагностики, медицинским сестрам. Оно будет также полезно студентам медицинских вузов.



НОВИНКА

ИЗДАТЕЛЬСКОГО ДОМА «ГЭОТАР-МЕД»



БИОХИМИЯ

Под ред. чл.-корр. РАН

Е.С. Северина

2002. — 764 с.

Переплет

В учебнике рассмотрены основные положения классической биохимии. Приведены сведения о структуре и свойствах биомолекул, биоэнергетике, молекулярных основах физиологических функций человека, биохимические особенности важнейших органов и тканей. Изложены современные представления о молекулярных основах нарушений при ряде патологических состояний и болезней.

Учебник предназначен студентам медицинских вузов и аспирантам.



НОВИНКА

ИЗДАТЕЛЬСКОГО ДОМА «ГЭОТАР-МЕД»

АТЛАС АНАТОМИИ ЧЕЛОВЕКА

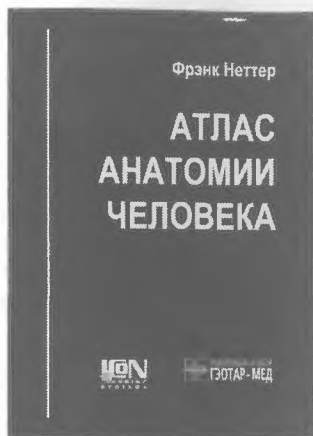
Ф. Неттер

Под ред. проф. Н.О. Бартоша

Пер. с англ. А.П. Киясова

2003. — 600 с.

Переплет



Атлас анатомии человека состоит из 8 частей, построенных в соответствии с топографическим принципом, его могут использовать студенты, изучающие как топографическую, так и нормальную анатомию человека.

Высокое качество и наглядность иллюстраций, а также многолетний опыт использования этого атласа студентами, преподавателями и практикующими врачами за рубежом стали предпосылками перевода на русский язык издания «Атласа анатомии человека».



**АНГЛИЙСКИЙ
ЯЗЫК:
учебник
для медицинских вузов
и медицинских
специалистов**

*И.Ю. Марковина, З.К. Максимова,
М.Б. Вайнштейн*

2003. — 368 с.

Переплет

Основной задачей учебника является формирование у студентов умения использовать английский язык как средство профессионального общения и самообразования, что предполагает овладение, прежде всего, навыками извлечения и обработки информации из иноязычного источника (чтение, перевод, аннотирование, реферирование медицинской литературы), а также устными коммуникативными навыками, необходимыми для обсуждения медицинской проблематики с иностранными коллегами.

Учебник состоит из следующих разделов: вводно-коррективный курс; основной курс: обучение чтению и переводу медицинской литературы, обучение устному профессиональному общению; грамматический справочник, англо-русский словарь к учебнику.

Учебное издание

Серия «Классический университетский учебник»

**Бочков Валерий Николаевич, Добровольский Анатолий Борисович,
Кушлинский Николай Евгеньевич, Логинов Василий Анатольевич,
Панченко Елизавета Павловна, Ратнер Елизавета Израилевна,
Творогова Мария Глебовна, Титов Владимир Николаевич,
Ткачук Всеволод Арсеньевич**

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Под редакцией В.А. Ткачука

2-е издание, исправленное и дополненное

Зав. редакцией
О. В. Кириллова

Зам. зав. редакцией
А. В. Одноровова

Художники
В. А. Чернецов, Н. С. Шувалова

Техническая группа
З. С. Люманова, О. А. Ильина

Художественное оформление серии выполнено
Издательством Московского университета и издательством «Проспект»
по заказу Московского университета